



Inês Isabel Caiado Ropio

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Biobaterias alimentadas por glucose para aplicações médicas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora: Isabel Ferreira, Professora Associada, FCT/UNL

Co-orientadora: Ana Catarina Baptista, Investigadora de Pós-Doutoramento, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho e Silva

Vogal: Prof. Doutora Isabel Maria Mercês Ferreira



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2015

Inês Isabel Caiado Ropio

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

***Biobaterias alimentadas por glucose para
aplicações médicas***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadora: Isabel Maria Mercês Ferreira, Professora Associada, Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Ana Catarina Bernardino Baptista, Investigadora de Pós-Doutoramento, Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho e Silva

Vogal: Prof. Doutora Isabel Maria Mercês Ferreira

Março, 2015

Biobaterias alimentadas por glucose para aplicações médicas

Copyright © 2015. Todos os direitos reservados. Inês Isabel Caiado Ropio, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este trabalho de investigação não teria sido possível sem a colaboração de várias pessoas que me acompanharam ao longo de todo o percurso e que me auxiliaram sempre que precisei.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Isabel Ferreira e à Doutora Ana Baptista, minha orientadora e co-orientadora respetivamente, pela oportunidade de realizar este projeto. À Professora Isabel, um profundo agradecimento pela motivação, disponibilidade, apoio e por todos os conhecimentos que me transmitiu. À Doutora Ana Baptista, pela confiança, por todo o tempo dispensado na partilha dos seus conhecimentos, pelo incansável apoio, preocupação, dedicação e pela amizade, um *Muito Obrigada*.

A todos os elementos do DCM e do CENIMAT, pela disponibilidade na utilização de todos os equipamentos que contribuíram para o concretizar desta dissertação. Gostaria também de agradecer à Professora Célia Henriques e ao Professor Jorge Carvalho e Silva pela colaboração e conhecimentos transmitidos.

Um agradecimento muito especial ao Professor João Paulo Borges, ao Carlos João, à Alexandra Rodrigues e também ao Paulo Duarte pela ajuda e por todas as ideias fantásticas que me deu.

Às minhas queridas amigas e colegas de laboratório, Mariana Ferrão, Ana Sousa e Diana Machado, pelo companheirismo, boa disposição (com muitas gargalhadas!) e incentivo. À Filipa Belo, ao Tomás Correia e à Catarina Castro, *Obrigada* pelo apoio e desejo-vos imensa sorte para esta nova fase do vosso percurso académico.

A todos os meus amigos de faculdade, em especial à Andreia Serrano, à Joana Reis, ao Pedro Azevedo, à Ana Luísa Gonçalves, ao João Tavares, ao Rui Dinis, à Alexandra Silva e à minha afilhada Marta Carvalho, só posso agradecer por tudo e dizer que a minha experiência de faculdade não teria sido igual sem a vossa presença.

Um grande *Obrigada* à Alexandra e à Joana, pela amizade de sempre, pelos conselhos tão importantes e presença constante em todo o meu percurso. Ao Rui, pela especial ajuda que me deu nesta fase, pelo apoio e pela paciência!

Por último, mas mais importante que tudo, quero agradecer à minha família. Aos meus pais, Carla e Renato, que são o exemplo que tento seguir e que sempre lutaram para me proporcionar o melhor, ao meu irmão Pedro, aos meus avós Emília, Francisco e Renato, aos meus tios Sílvia e Claude, a todos um enorme *Obrigada* pelo amor e apoio incondicional.

A todos, Muito Obrigada!

Resumo

No desenvolvimento tecnológico na área da medicina contemporânea procuram-se, cada vez mais, respostas no sentido da miniaturização e facilidade de utilização dos dispositivos eletrônicos. De forma a minimizar os custos associados aos mesmos, é pertinente a procura de recursos naturais que possam alimentar os biodispositivos.

Neste trabalho, pretendeu-se produzir e caracterizar uma biobateria para alimentação de um dispositivo eletrônico de baixo consumo energético para que gerasse energia elétrica a partir de glucose.

Para garantir a flexibilidade, baixa espessura e porosidade, essenciais para o objetivo em causa, foram produzidas membranas de acetato de celulose por eletrofiação para que estas desempenhassem a função de suporte físico e separador dos elétrodos. Estes, por sua vez, foram produzidos através do revestimento da matriz de acetato de celulose com polímeros condutores e, como alternativa, foi utilizado óxido de grafeno reduzido.

Realizou-se uma caracterização das membranas produzidas, bem como dos elétrodos para avaliar a sua viabilidade enquanto dispositivo. Verificou-se a resistividade de todas as membranas embora, no caso dos elétrodos, ainda seja necessário fazer um estudo de modo a que estes preservem a condutividade elétrica inicial em meio fisiológico. Os métodos de lavagem após os revestimentos das membranas também devem ser melhorados para que sejam removidos subprodutos com um potencial tóxico para as células.

Efetua-se ainda uma análise das reações eletroquímicas por voltametria cíclica, com várias combinações de elétrodos e eletrólitos, verificando-se que estes influenciam a produção de energia. Foram testadas soluções de SBF com diferentes concentrações de glucose onde se verificou uma relação linear entre a concentração de glucose e a densidade de energia registada, atingindo-se um valor de $9,39 \text{ mA.cm}^{-2}$ para a concentração mais elevada de glucose.

Palavras-chave: biobateria, acetato de celulose, polímeros condutores, eletrofiação, glucose, voltametria cíclica.

Abstract

In technological development in the field of modern medicine are sought, increasingly, responses towards miniaturization and usability of electronic devices. In order to minimize the costs associated with them, it is imperative the demand for natural resources that could be a source of energy for the biodevices.

This work aims to produce and characterize a biobattery to generate electricity from glucose to provide power to an electronic device with low energy consumption.

To ensure flexibility, low thickness and porosity, that are essential for the purpose of this project, cellulose acetate membranes were produced by electrospinning. These membranes perform the physical support of the electrodes which were produced by coating of the cellulose acetate matrix with conductive polymers. Alternatively, it was used reduced graphene oxide.

The membranes and the electrodes were characterized to assess their feasibility as electronic device. The resistivity of all membranes was confirmed although, in the case of electrodes, it is still necessary to make a deep study to preserve the electrical conductivity in physiological media. The washing methodology used after the membrane coatings must also be improved to remove the by-products with a toxic potential to cells.

Finally, an analysis of electrochemical reactions was performed by cyclic voltammetry with various combinations of electrodes and electrolytes, leading to the conclusion that these combinations influence the production of energy. PBS solutions with different glucose concentrations were tested in order to verify the relationship between the glucose concentration and the energy density, which increases with the increasing of concentration. It was reached a value of 9,39 mA.cm⁻² for the highest glucose concentration.

Keywords: cellulose acetate, conductive polymers, electrospinning, glucose, cyclic voltammetry.

Índice de matérias

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de matérias	xi
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xix
Lista de siglas e acrónimos	xxi
Lista de símbolos	xxiii
Objetivos	xxv
Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Contextualização	1
1.2. Aplicabilidade e inovação do estudo efetuado	5
Capítulo 2. Componentes da biobateria	7
2.1. Matriz polimérica de acetato de celulose	7
2.2. Eléttodos	8
2.2.1. Polipirrol	8
2.2.2. Polianilina	9
2.2.3. Óxido de grafeno	10
2.3. Eletrólito	11
2.3.1. Glucose	11
Capítulo 3. Métodos experimentais	13
3.1. Produção e otimização das membranas de acetato de celulose	13
3.1.1. Eletrofiação	13
3.1.1.1. Processo	14
3.1.1.2. Controlo da morfologia das fibras – parâmetros de eletrofiação	14
3.2. Produção dos eléctrodos	17
3.2.1. Revestimentos com Polipirrol	17
3.2.2. Revestimentos com Polianilina	18

3.2.3.	<i>Produção de membranas com óxido de grafeno reduzido</i>	19
3.3.	Caracterização da solução	21
3.3.1.	<i>Viscosimetria</i>	21
3.4.	Caracterização das membranas	23
3.4.1.	<i>Propriedades morfológicas e estruturais</i>	24
3.4.1.1.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	24
3.4.1.2.	Taxa de inchamento	25
3.4.2.	<i>Degradação das membranas</i>	25
3.4.3.	<i>Citotoxicidade</i>	27
3.5.	Caracterização elétrica e eletroquímica	29
3.5.1.	<i>Condutividade Elétrica</i>	29
3.5.2.	<i>Voltametria Cíclica</i>	30
3.5.3.	<i>Determinação da tensão de circuito aberto</i>	32
Capítulo 4.	Apresentação e discussão de resultados	33
4.1.	Caracterização da solução	33
4.1.1.	<i>Viscosidade intrínseca</i>	33
4.2.	Produção e otimização das membranas de acetato de celulose	35
4.2.1.	<i>Morfologia das fibras produzidas por eletrofiação</i>	35
4.2.2.	<i>Influência dos vários parâmetros no diâmetro médio das fibras</i>	38
4.2.3.	<i>Número de Berry</i>	39
4.3.	Caracterização das membranas produzidas	41
4.3.1.	<i>Taxa de inchamento</i>	41
4.3.2.	<i>Degradação das membranas</i>	42
4.3.3.	<i>Citotoxicidade</i>	45
4.4.	Caracterização elétrica e eletroquímica	47
4.4.1.	<i>Condutividade elétrica</i>	47
4.4.1.1.	Elétrodos poliméricos	47
4.4.1.2.	Óxido de grafeno	48
4.4.2.	<i>Determinação da tensão de circuito aberto</i>	50
4.4.3.	<i>Voltametria Cíclica</i>	50
4.4.3.1.	Influência dos elétrodos	50
4.4.3.2.	Estabilidade e reprodutibilidade	54
4.4.3.3.	Influência dos eletrólitos	55
Capítulo 5.	Conclusões e perspectivas futuras	57
	Referências bibliográficas	59
	Anexos	63
	Anexo A – Preparação das soluções de eletrólitos	63
	Anexo B – Procedimento para preparação da solução de PBS (estudo de degradação)	65

Anexo C – Procedimento para preparação de culturas celulares e determinação da citotoxicidade	67
Anexo D – Estudo da otimização de produção de membranas por eletrofiação.....	71
Anexo E – Espectros do mapeamento por EDS dos elétrodos poliméricos antes e após o estudo de degradação	73
Anexo F – Influência das diferentes velocidades de varrimento e da espessura nos ensaios de voltametria cíclica.....	75

Lista de Figuras

Figura 1.1 Ilustração da flexibilidade e espessura da bateria desenvolvida por Sha Li e restantes investigadores. a) Membrana de celulose com o eléctrodo PPI-NTC e b) Filme de PPI-NTC sem a membrana de celulose. (adaptado de [1]).	3
Figura 1.2 Figura esquemática das reações ocorridas nos eléctrodos da biobateria desenvolvida por Jen-Yuan Wang e respetiva equipa quando em contacto com o eletrólito correspondente a cada eléctrodo (adaptado de [11]).	4
Figura 2.1 Estrutura do acetato de celulose (adaptado de [14]).	8
Figura 2.2 Estrutura da polianilina para diferentes estados de redução e oxidação (adaptado de [19]).	10
Figura 2.3 Estrutura da glucose (adaptado de [23]).	11
Figura 3.1 Ilustração esquemática da técnica de eletrofiação (adaptado de [25]).	14
Figura 3.2 Ilustração do equipamento de eletrofiação e deposição de fibras de AC no coletor. ..	16
Figura 3.3 Esquema do procedimento do revestimento da membrana de AC com PPI.	18
Figura 3.4 Revestimentos de polipirrol das membranas de AC (a e b).	18
Figura 3.5 Esquema do procedimento do revestimento da membrana de AC com PAni.	19
Figura 3.6 a) Solução de polianilina em gelo produzida para os revestimentos das membranas de AC; b) Membrana revestida por polianilina.	19
Figura 3.7 a) Câmara de vapores utilizada para a redução do óxido de grafeno presente nas membranas; b) Membrana com 2% de OG reduzido na câmara de vapores com hidrazina a uma temperatura de 40°C, durante 2 horas; c) Membrana com 1% de OG reduzido na câmara de vapores com hidrazina e sem temperatura, durante 12 horas.	21
Figura 3.8 Diagrama esquemático do funcionamento do viscosímetro (adaptado de [30]).	23
Figura 3.9 Amostras do estudo de degradação no interior da estufa, que permaneceu a 37°C durante 3 meses.	27
Figura 3.10 Método utilizado para os testes de citotoxicidade: a) A membrana é retirada do meio de cultura após imersão e b) O meio de cultura que esteve em contacto com a membrana é colocado nos poços com a cultura celular.	28
Figura 3.11 Amostras colocadas junto às pontas de prova do microprovador para a realização das medições.	30
Figura 3.12 Voltamograma Cíclico (adaptado de [39]).	31
Figura 3.13 a) Representação de uma das baterias utilizadas, com eléctrodos de polipirrol e de polianilina e b) Montagem utilizada para os ensaios eletroquímicos.	32

Figura 4.1 Gráfico da viscosidade específica em função da concentração e respetiva reta de regressão linear para o cálculo da viscosidade intrínseca.	34
Figura 4.2 Imagens de SEM das nanofibras de AC produzidas por eletrofiação: a) Membrana de 5% de AC (20kV, 15 cm, 0,1 ml.h ⁻¹); b) 8% AC (20kV, 15 cm, 0,2 ml.h ⁻¹); c) 10% AC (20kV, 15 cm, 0,2 ml.h ⁻¹); d) 12% AC (20kV, 10 cm, 0,2 ml.h ⁻¹); e) 12% AC (20kV, 10 cm, 0,4 ml.h ⁻¹); f) 12% AC (20kV, 15 cm, 0,2 ml.h ⁻¹); g) 12% AC (15kV, 10 cm, 0,4 ml.h ⁻¹) e h) 14% AC (20kV, 15 cm, 0,1 ml.h ⁻¹).	37
Figura 4.3 Histograma com a distribuição de diâmetros para as fibras produzidas a partir de eletrofiação (tensão de 20 kV, distância a 15 cm e um caudal de 0,2 ml.h ⁻¹) com uma solução de concentração 12% (m/m) de AC.	38
Figura 4.4 Influência da concentração de AC no diâmetro médio das fibras produzidas por eletrofiação.	39
Figura 4.5 Gráfico do diâmetro médio das fibras em função do Número de Berry $[\eta]C$	40
Figura 4.6 Gráfico da taxa de inchamento em função do tempo de imersão.	41
Figura 4.7 Gráfico da perda de massa das membranas de AC em função do tempo de imersão em PBS (a 37°C).	42
Figura 4.8 Imagens SEM das membranas sujeitas ao estudo de degradação: a) Membrana retirada na primeira semana de imersão em PBS; b) Membrana retirada após 73 dias de imersão e c) Membrana retirada após 94 dias de imersão (tempo total do estudo).	43
Figura 4.9 Gráfico da perda de massa das membranas de AC revestidas com polipirrol (a preto) e revestidas com polinilina (a vermelho) em função do tempo de imersão em PBS (a 37°C).	44
Figura 4.10 Valores de absorvância medidos após a) 24 horas e b) 48 horas de contacto das culturas celulares com os respetivos meios condicionados.	45
Figura 4.11 Montagem da placa de 50 poços para a cultura celular após a adição de resazurina (à esquerda após as 24 horas de contacto com o meio condicionado e à direita após 48 horas).	46
Figura 4.12 Imagens SEM referentes às amostras utilizadas para o estudo de degradação: a) Membrana de AC revestida com PPI antes do estudo; b) Membrana revestida com PPI após sofrer degradação; c) Membrana revestida com PANi antes do estudo; d) Membrana revestida com PANi após sofrer degradação.	48
Figura 4.13 Imagens de SEM das membranas de 12% (m/m) de AC com óxido de grafeno após redução com vapores de hidrazina: a) 1% (m/m) de OG após 12 horas de redução e b) 2% (m/m) de OG depois de 48 horas de redução.	49
Figura 4.14 Gráfico da tensão de circuito aberto (V_{oc}) para as diferentes combinações de elétrodos com SBF como eletrólito.	50
Figura 4.15 Combinações de elétrodos testados com PANi no elétrodo de trabalho e diferentes contra-elétrodos: a) Au; b) PPI e c) OGR.	51

Figura 4.16 Voltamogramas (5º ciclo) obtidos para várias combinações de elétrodos (PAni no elétrodo de trabalho), com uma velocidade de varrimento de 80 mV.s^{-1}	51
Figura 4.17 Combinações de elétrodos testados com PPI no elétrodo de trabalho e diferentes contra-elétrodos: a) PAni; b) Au e c) OGR.....	53
Figura 4.18 Voltamogramas (5º ciclo) obtidos para várias combinações de elétrodos (PPI no elétrodo de trabalho), com uma velocidade de varrimento de 80 mV.s^{-1}	53
Figura 4.19 Voltamogramas (4º, 7º e 10º ciclo) para os elétrodos PPI (E-T) /PAni (C-E).....	55
Figura 4.20 Voltamogramas (10º ciclo) para as várias concentrações de glucose (50 mg/dL, 100 mg/dL, 150 mg/dL e 200 mg/dL) com os elétrodos PPI (E-T) /PAni (C-E).	56

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Parâmetros variados para a realização do estudo de eletrofiação	17
Tabela 3.2 Representação dos minutos em que ocorreu a pesagem das membranas, após a imersão das mesmas em água destilada	25
Tabela 3.3 Quantidade de membranas retiradas em cada mês durante o estudo de degradação	26
Tabela 4.1 Valores adquiridos para os tempos de escoamento do solvente puro (t_0), das diferentes concentrações de solução (t_i) e cálculo da viscosidade específica (η_{sp})	34
Tabela 4.2 Diâmetros médios para as diferentes condições utilizadas durante a eletrofiação	35
Tabela 4.3 Número de Berry para cada concentração de AC e respectivos diâmetros médios das fibras produzidas	40
Tabela 4.4 Condutividades elétricas para os elétrodo de polipirrol e polianilina	47
Tabela 4.5 Condutividades elétricas para os elétrodo de polipirrol e polianilina após o estudo de degradação.....	47
Tabela 4.6 Condutividades elétricas para várias horas de redução do óxido de grafeno	48
Tabela 4.7 Condutividades elétricas para vários tempos de redução do óxido de grafeno a 40°C	49
Tabela 4.8 Densidades de corrente para as soluções de SBF com diferentes concentrações de glucose	56

Lista de siglas e acrónimos

AC	Acetato de celulose
AFM	Microscopia de força atómica (do inglês, <i>Atomic force microscopy</i>)
Ani	Anilina
ATP	Adenosina trifosfato
Au	Ouro
Be	Número de Berry
C-E	Contra eletrodo
CENIMAT	Centro de investigação de materiais
DMAc	Dimetilacetamida
DMEM	Meio de cultura (do inglês, <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>)
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia de raios X
E-T	Eletrodo de trabalho
FCT/UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa
FeCl₃	Cloreto de ferro (III)
GDH	Glucose desidrogenase
GOx	Glucose oxidase
HCl	Ácido clorídrico
M	Massa molar
Mw	Peso molecular (do inglês, <i>Molecular weight</i>)
NTC	Nanotubos de carbono
NTCPMc	Nanotubos de carbono de parede múltipla carboxilados
OG	Óxido de grafeno
OGR	Óxido de grafeno reduzido
PAni	Polianilina

PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>)
Pi	Pirrol
PMA	Poli(metileno) azul
PPi	Polipirrol
Ref.	Elétrodo de referência
SBF	Fluido corporal simulado (do inglês, <i>Simulated body fluid</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês, <i>Scanning electron microscope</i>)

Lista de símbolos

%(m/m)	Percentagem em massa
[η]	Viscosidade intrínseca
A	Área
Be	Número de Berry
C	Concentração, em g.ml ⁻¹
Ep	Pico de potencial
I	Corrente
Ip	Pico de corrente
jpa	Densidade de corrente do pico anódico
jpc	Densidade de corrente do pico catódico
L	Comprimento
Md	Massa das amostras após imersão
Mi	Massa inicial
R	Resistência
t0	Tempo de escoamento para o solvente puro
ti	Tempo de escoamento para as diferentes concentrações de AC
v	Velocidade de varrimento
V	Tensão elétrica
Voc	Tensão de circuito aberto
η	Viscosidade
η_{sp}	Viscosidade específica
σ	Condutividade elétrica
τ	Tensão de corte

Objetivos

A presente dissertação teve como base uma investigação realizada durante um período de 6 meses, no Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade Nova de Lisboa.

Este trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de um biodispositivo eletroquímico para produção de energia elétrica, tendo como fonte a glucose presente nos fluidos biológicos (sangue). Poderá ser utilizado em dispositivos médicos de baixo consumo e tem como principais características a facilidade de produção, baixo custo, flexibilidade e espessura reduzida.

Foi tido como base o trabalho *Produção de biobaterias a partir de membranas obtidas pela técnica de eletrofiação*, desenvolvido pela Doutora Ana Baptista, com a orientação da Prof. Doutora Isabel Ferreira e do Prof. Doutor João Paulo Borges.

O projeto dividiu-se nas seguintes fases:

- i. Produção e respetiva otimização das membranas de acetato de celulose pela técnica de eletrofiação;
- ii. Caracterização das membranas;
- iii. Produção e caracterização elétrica e eletroquímica dos eletrodos;
- iv. Demonstração da potencialidade da utilização da glucose como fonte de energia para o biodispositivo.

Todo o trabalho desenvolvido é apresentado nos 5 capítulos seguintes. No capítulo 1, é descrito o estado de arte na área das biobaterias e é mencionada a proposta desta dissertação para complementar a literatura existente. No capítulo 2, são apresentados os componentes da biobateria e quais os materiais escolhidos. No capítulo 3 são descritos os métodos experimentais e quais os procedimentos realizados, seguindo-se o capítulo 4, no qual são apresentados os resultados experimentais. Por fim, no capítulo 5, são referidas as conclusões e o trabalho futuro que ainda se poderá fazer no sentido desta investigação.

Capítulo 1. Introdução

Na área da saúde procura-se, cada vez mais, a utilização de dispositivos eletrônicos miniaturizados, portáteis ou que possam ser implantados facilmente no corpo humano, minimizando a ocorrência de reações inflamatórias. Estes necessitam de ser altamente biocompatíveis e é uma vantagem se não for necessária a utilização de reagentes químicos perigosos para a sua alimentação. [1], [2] Com o intuito de converter a energia disponível em energia elétrica, têm-se realizado alguns estudos de modo a aproveitar a energia eletroquímica de compostos presentes nos fluidos biológicos, como por exemplo a glucose, que poderão funcionar como eletrólitos em biobaterias que não necessitem de ser substituídas quando implantadas. Esta seria uma vantagem relativamente às atuais que precisam de ser substituídas no final do seu período de vida útil, sujeitando o paciente a cirurgias regulares, como acontece nas tradicionais baterias utilizadas em *pacemakers*, por exemplo.

1.1. Contextualização

Para que uma bateria possa ser denominada de “biobateria”, esta tem de ser construída com materiais biocompatíveis possibilitando a sua utilização *in vivo* e usar um processo de conversão também biocompatível. Desta forma, no caso de aplicações que necessitem de ser implantadas no corpo humano, a bateria terá de ser pequena e flexível para que seja implantada facilmente e adaptável ao dispositivo que se pretende alimentar. De entre as grandes vantagens das biobaterias que utilizam fluidos corporais, destacam-se a fonte quase inesgotável de energia e o baixo custo de produção. [1]

Uma biobateria eletroquímica contém um ânodo (negativo), um cátodo (positivo), um suporte para os mesmos que pode funcionar também como separador e um eletrólito que deverá ser natural, tal como um biofluido. As reações entre os compostos presentes no eletrólito e o transporte iónico entre os elétrodos da biobateria irão provocar a libertação de eletrões que acumular-se-ão no ânodo e, devido à diferença elétrica entre o ânodo e o cátodo, os eletrões

tendem a mover-se no sentido do cátodo. [3] Esta movimentação será a responsável pela produção de uma corrente elétrica. [4]

Para além das biobaterias, também as biocélulas de combustível (*biofuel cells*) convertem o seu próprio combustível em energia elétrica ou calor ininterruptamente e continuam funcionais até este terminar, mas sem o armazenamento da energia. [5]

Grande parte das biocélulas de combustível utiliza enzimas como eléctrodos que requerem temperaturas e pH específicos (temperatura ambiente, pH neutro). [6] Uma fonte de combustível bastante estudada tem sido a glucose, pois permite uma alimentação prolongada ou até mesmo permanente, que vai sofrer reações de oxidação-redução provocadas pelas enzimas e, consequentemente são libertados electrões. [4]

No ano de 2014, um grupo de investigadores desenvolveu uma biocélula de combustível de glucose e oxigénio (O_2), constituída por nanofibras de colagénio e nanotubos de carbono (NTC), produzidas por eletrofiação e que utiliza enzimas como biocatalisadores. As enzimas foram incorporadas nas nanofibras para melhorar a transferência de electrões entre estas e os eléctrodos. Foi atingida uma densidade de potência de cerca de $14,3 \mu W cm^{-2}$, com uma perda de 5% do valor inicial após 12 horas de funcionamento contínuo. [7]

Em 2011, Vlad Oncescu e Davis Erickson produziram uma biocélula de combustível que não utiliza enzimas como eléctrodos, nem dispõe de um separador entre os mesmos, apenas um suporte constituído por papel de carbono. Sem uma membrana separadora, a biocélula de combustível final terá um menor volume e existirão menos perdas energéticas. Assim, um cátodo seletivo que catalisa a oxidação da glucose na presença de oxigénio é colocado junto ao ânodo. Como o oxigénio é reduzido no cátodo, algum deste presente em solução é removido antes que neutralize o ânodo, permitindo que a oxidação da glucose ocorra com baixas concentrações de oxigénio. No entanto, tem de existir uma determinada distância entre os eléctrodos, abaixo de um determinado valor, a densidade de potência produzida começa a diminuir e o gradiente de concentração no ânodo é afetado. Foi atingido um máximo de densidade de potência de $2 \mu W cm^{-2}$ para uma distância de $160 \mu m$ entre os eléctrodos. [8]

As biobaterias, como referido anteriormente, apenas produzem energia resultante de reações químicas que ocorrem entre o eletrólito e os eléctrodos. São, por isso, indicadas para implantes médicos eletrónicos devido à sua capacidade de funcionarem durante um longo período de tempo sem a necessidade de serem recarregadas. [2]

Em 2007, Pushparaj e a sua equipa, produziram uma biobateria que engloba os três componentes essenciais, ou seja, é constituída por eléctrodos, por uma membrana separadora e por um eletrólito. Esta bateria teve como vantagem o facto de ter um separador bastante flexível,

fino e poroso feito de celulose (o principal constituinte do papel). Um dos elétrodos, correspondente ao cátodo, foi feito a partir de nanotubos de carbono (NTC) e o ânodo composto por lítio, depositado na forma de filme fino. O eletrólito será um composto natural como o suor, sangue ou urina. Por exemplo, no caso do suor como eletrólito, a biobateria atingiu uma tensão de 2,4V. [9]

Mais tarde, um grupo de investigadores da Faculdade de Ciências e Tecnologias, da Universidade Nova de Lisboa, construiu uma biobateria biocompatível cuja membrana separadora foi desenvolvida através da técnica de eletrofiação, o que lhe conferiu uma estrutura ultrafina e flexível. Os elétrodos (de prata e de alumínio) foram integrados na mesma estrutura, um em cada uma das faces da membrana, sendo depositados na forma de filme fino por evaporação térmica resistiva em vácuo. Como eletrólito podem ser usados suor ou plasma sanguíneo e, no caso do contacto com a pele transpirada, foi atingido um máximo de densidade de potência de $3,38 \mu\text{W cm}^{-2}$. Este protótipo pode ter aplicações desde a biomedicina à indústria alimentar, tal como o controlo de qualidade alimentar. Os autores sugerem que, para se chegar a valores de tensão mais elevados, se podem agrupar várias células em série, de modo a abranger um maior número de aplicações da biobateria. [2]

Já em 2013, investigadores australianos, da Universidade de Wollongong, também desenvolveram uma bateria a partir de um método bastante simples e económico. Foi utilizada uma membrana de celulose como separador e esta foi revestida com uma camada fina constituída por polipirrol e por nanotubos de carbono (PPi – NTC) que funcionou como cátodo. O polipirrol foi revestido pelos nanotubos de carbono pelo método de polimerização química, conferindo à estrutura uma elevada porosidade, grande área superficial e flexibilidade, como se pode comprovar na figura 1.1.

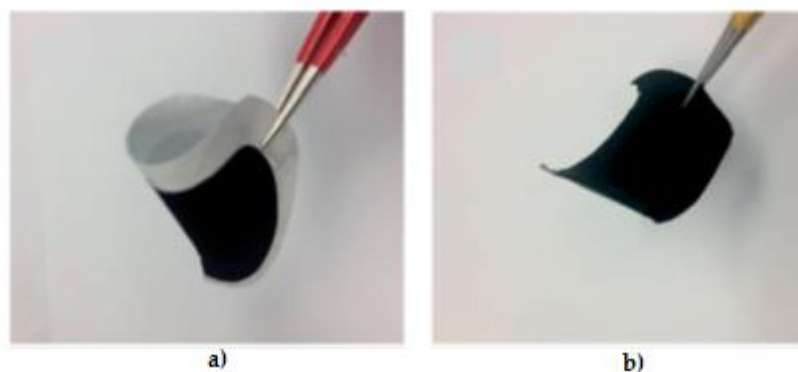


Figura 1.1 Ilustração da flexibilidade e espessura da bateria desenvolvida por Sha Li e restantes investigadores. a) Membrana de celulose com o elétrodo PPI-NTC e b) Filme de PPI-NTC sem a membrana de celulose. (adaptado de [1]).

O zinco foi o material escolhido para o ânodo devido à sua biocompatibilidade e reações de interface moderadas na presença de um eletrólito aquoso. Foram simulados fluidos corporais para funcionarem como eletrólito, tendo atingido melhor desempenho na descarga da bateria com 0,1 M de polipirrol e 0,4 mg.ml⁻¹ de nanotubos de carbono. [1]

A glucose tem um grande potencial como fonte de energia eletroquímica para as biobaterias dada a sua abundância nos organismos vivos, disponibilidade, não é nociva para o organismo e é a fonte de energia universal nos seres vivos. [10]

Sendo assim, Jen-Yuan Wang e a sua equipa de investigação, realizaram em 2012, um protótipo de uma biobateria alimentada por glucose e independente de oxigénio. Atualmente ainda é recorrente a utilização de enzimas como elétrodos para dispositivos alimentados por glucose, nomeadamente a glucose oxidase (GOx) e a glucose desidrogenase (GDH). Como o intuito do trabalho abordado foi a construção de um dispositivo não dependente de oxigénio, a enzima escolhida foi a glucose desidrogenase que não usa o oxigénio diatómico como recetor de eletrões. Esta enzima, juntamente com poli(metileno) azul (PMA) e nanotubos de carbono de parede múltipla carboxilados (NTCPMc), serviu para a construção de um bioânodo. O cátodo foi construído com grafite e sem a adição de nenhuma enzima. O separador consistiu numa membrana de Nafion®. O bioânodo foi colocado em contacto com uma solução de tampão fosfato salino (PBS) para que o pH se mantivesse constante (pH 7) com 1,0 M de glucose e 10 mM de NADH, enquanto que o cátodo foi colocado numa solução de 50 mM de iodeto e 5,0 mM de iodo em PBS, como é ilustrado na figura 1.2.

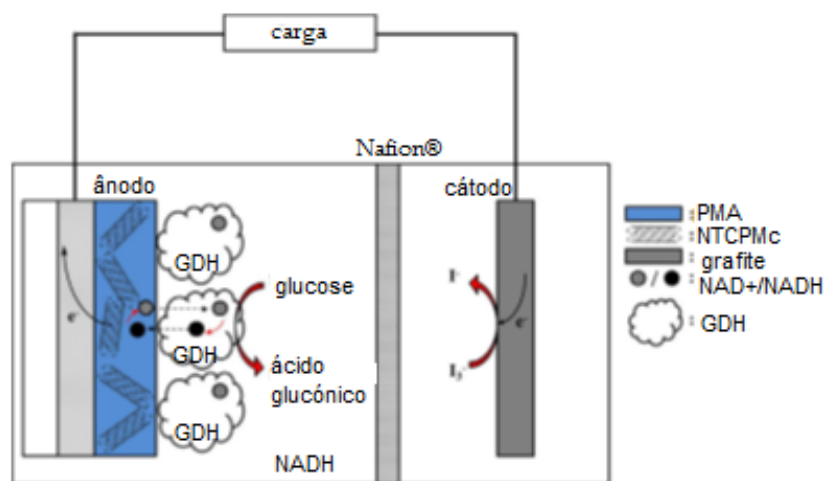


Figura 1.2 Figura esquemática das reações ocorridas nos elétrodos da biobateria desenvolvida por Jen-Yuan Wang e respetiva equipa quando em contacto com o eletrólito correspondente a cada elétrodo (adaptado de [11]).

Os NTCPMc, devido à sua porosidade, permitiram uma maior deposição de PMA e, consequentemente, melhorou a densidade de potência registrada que correspondeu a $2,43 \mu\text{W cm}^{-2}$. [11]

Por vezes, quando as baterias são mediadas por poucas enzimas, ocorre a oxidação incompleta da glucose, o que leva a uma diminuição da densidade de energia que seria possível obter. Considerando este problema, em 2014, Zhiguang Zhu e os seus colaboradores da Universidade da Virgínia (*Virginia Tech*), criaram uma bateria com cerca de 13 enzimas de forma a oxidar completamente a glucose presente na maltodextrina (resultante da hidrólise do amido, que contém uma densidade de energia 11% superior à da glucose). Estas enzimas, compreendidas numa via catabólica de ATP (sintético) e coenzima A livre (CoA), não se encontram imobilizadas, pois os autores defendem que as enzimas imobilizadas produzem uma menor quantidade de energia e diminuem o período de vida útil da bateria. Obteve-se uma potência máxima de $0,8 \text{ mW cm}^{-2}$ e uma densidade de corrente de 6 mA cm^{-2} . [12]

1.2. Aplicabilidade e inovação do estudo efetuado

A glucose é uma fonte de energia promissora no sentido em que é uma fonte natural abundante, renovável, de baixo custo e não é tóxica. Contudo, com base na literatura existente, verifica-se a necessidade de desenvolver uma biobateria alimentada por glucose, mas sem o uso de enzimas como catalisador. Os elétrodos abióticos (sem enzimas) são mais indicados em implantes médicos, permanentes ou de utilização prolongada, pois apresentam uma maior estabilidade, embora não sejam tão eficientes. [3] Para além disso, as enzimas têm um período de vida limitado e apenas atuam sob condições de temperatura e pH específicos para que não seja provocada a sua desnaturação, o que é difícil de controlar tão rigorosamente em meio fisiológico. [7]

Nesse sentido, é importante que a biobateria que irá ser desenvolvida seja constituída por materiais biocompatíveis e que não sejam libertados compostos tóxicos para o organismo, resultantes dos processos eletroquímicos envolvidos. A biobateria terá uma membrana que servirá como suporte e como separador, constituída por acetato de celulose e, produzida pela técnica de eletrofiação, uma técnica económica que confere propriedades à membrana que irão melhorar o seu funcionamento, tais como elevada porosidade, flexibilidade e elevada área superficial. O acetato de celulose é um dos derivados da celulose, um polímero natural bastante

abundante e insolúvel em muitos solventes orgânicos, o que se torna uma vantagem para o dispositivo que se pretende desenvolver.

Como elétrodos pretende-se estudar a utilização de polímeros condutores, como o polipirrol e a polianilina. Será também testada uma rede metálica flexível (comercial) de ouro e óxido de grafeno reduzido.

A aplicabilidade da biobateria será, maioritariamente, na área da biomedicina, por exemplo, na alimentação de dispositivos médicos de baixo consumo energético, como o *pacemaker*, aparelhos para estimulação muscular ou para diagnóstico médico, como por exemplo, para monitorização de parâmetros importantes tal como a concentração de glucose em diabéticos.

[4]

Capítulo 2. Componentes da biobateria

Neste capítulo são descritos os materiais que integram a biobateria e quais as suas principais características para que se considerem adequados para o dispositivo em causa. O acetato de celulose é o constituinte da membrana separadora e foi também utilizado na produção de membranas para serem revestidas com polipirrol e polianilina para a formação dos elétrodos poliméricos. Para além disso, estudou-se a aplicabilidade do óxido de grafeno reduzido como uma alternativa aos elétrodos referidos anteriormente.

É de extrema importância que os elétrodos permitam a migração iónica no interior da matriz polimérica (membrana de acetato de celulose) através da criação de um campo elétrico entre os mesmos e que, simultaneamente, conservem as suas propriedades tais como a porosidade importantes para a penetração do eletrólito.

2.1. Matriz polimérica de acetato de celulose

Os produtos derivados da celulose sempre foram utilizados na indústria, mas ultimamente têm tido bastante procura nas áreas relacionadas com a saúde, por exemplo, como matriz de suporte celular (*scaffold*) na Engenharia de Tecidos porque, para além de ser um material abundante, barato e reciclável, é biocompatível e tem boas propriedades mecânicas. [13]

O acetato de celulose (figura 2.1) é obtido através da modificação da celulose com materiais que contenham grupos acetil para a formação do polímero de acetato de celulose, tais como o ácido acético (solvente) e o anidrido acético (agente acetilante) na presença de ácido sulfúrico que atua como catalisador e será neutralizado durante o processo. [14] O ácido acético pode ser produzido por processos naturais ou sintéticos e é um dos principais componentes do vinagre, por outro lado, o anidrido acético é produzido quando se combinam duas moléculas de ácido acético e é removida uma molécula de água. [15] O acetato de celulose é então formado pela substituição dos grupos hidroxilo das unidades de glucose por grupos acetil. [14]

Podem resultar polímeros com diferentes graus de substituição, que correspondem ao número médio de grupos acetil que substituem os grupos hidroxilo por cada unidade glicosídica.

O grau de substituição influencia a biodegradabilidade, a cristalinidade e a solubilidade do polímero. Por exemplo, a celulose é insolúvel na maioria dos solventes porque tem um grau de substituição igual a zero, mas à medida que este aumenta, também o número de solventes em que o polímero se irá dissolver aumenta. [14]

Este foi o polímero escolhido para o desenvolvimento da membrana da biobateria devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade, por ser solúvel num pequeno número de solventes, sendo estável em meio fisiológico.

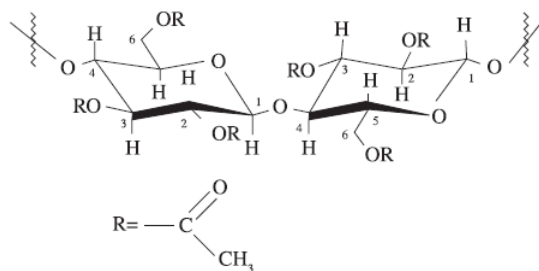


Figura 2.1 Estrutura do acetato de celulose (adaptado de [14]).

2.2. Eléttodos

2.2.1. Polipirrol

Os polímeros condutores têm em comum uma estrutura conjugada de ligações duplas de carbono alternadas com ligações simples e é esta estrutura que lhes confere propriedades de condutores elétricos. Esta propriedade deve-se à existência de reações de oxidação-redução nos locais onde existem as ligações duplas acima referidas pois aí a energia de ionização é relativamente baixa e à consequente libertação de iões, que se podem mover para dentro ou para fora do polímero, dependendo da carga do mesmo.

A adição de dopantes a estes polímeros pode influenciar bastante a sua condutividade. À medida que as moléculas dopantes são introduzidas, estas atuam como agentes oxidantes ou redutores, existindo uma troca de cargas elétricas entre as moléculas dopantes e as moléculas poliméricas com uma consequente variação no grau de protonação do polímero. [16]

O polipirrol (PPI), um polímero condutor, é muito utilizado na área da biomedicina devido à sua biocompatibilidade, flexibilidade e fácil preparação. Estudos realizados comprovam a biocompatibilidade do polímero referido como, por exemplo, a co-cultura celular de neurónios e células de *Schwann* de nervos periféricos de ratos em polipirrol *in vitro* e em polipirrol para a substituição de uma parte de um nervo periférico de um mamífero (*in vivo*) realizado por Wang e a sua equipa, em 2003. Ambas as culturas obtiveram bons resultados, embora tenha existido

uma melhor migração celular na cultura *in vivo*, onde não foram verificadas alterações no meio envolvente após a análise dos resultados de testes de toxicidade, testes alérgicos e testes ao sangue. [17]

Pode-se sintetizar o polipirrol quimicamente ou electroquimicamente. Por exemplo por polimerização do monómero pirrol. No seu estado reduzido comporta-se como isolante e, quando oxidado, possui uma elevada condutividade elétrica. A síntese química inclui a utilização de um agente oxidante, o cloreto de ferro (FeCl_3), que é adicionado a uma solução com pirrol. A síntese eletroquímica é mais simples e é necessária a aplicação de uma tensão que provocará a oxidação, com a extração de um eletrão da estrutura e a criação de radicais livres dos monómeros. Estes radicais ligam-se covalentemente uns aos outros ou a outros radicais livres presentes na solução, levando à criação de filmes finos de polipirrol. Para aumentar a condutividade do polímero resultante, pode-se adicionar um agente dopante à solução que vai oxidar o filme fino de polipirrol. [16], [17]

2.2.2. Polianilina

A polianilina (PAni) é um polímero condutor que resulta da polimerização oxidativa da anilina num meio ácido. Esta é muito utilizada devido à sua facilidade de polimerização, estabilidade química e térmica e biocompatibilidade. A PAni é facilmente alterada para um polímero condutor através da protonação na presença de ácidos fortes, ao contrário do polímero condutor referido anteriormente, o polipirrol, que é transformado em polímero condutor com reações de oxidação ou redução da cadeia polimérica. [18]

A anilina é transformada em polianilina por oxidação química ou eletroquímica. Na oxidação química, utiliza-se o ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico e persulfato de amónia como agente oxidante. Na oxidação eletroquímica são formados filmes finos puros e não é necessária a utilização de um agente oxidante, apenas a presença de um metal (nobre, de transição ou de outro tipo como o vidro condutor). Seguidamente aplica-se uma tensão constante à solução do monómero anilina para provocar a oxidação do mesmo. Controlar o pH em que ocorrem estas sínteses (tanto química como eletroquímica) é bastante importante pois vai influenciar em muito a estrutura do polímero resultante.

A polianilina pode apresentar-se na forma totalmente reduzida (leucoesmeraldina), totalmente oxidada (pernigranilina) ou apresentar o mesmo número de grupos reduzidos e oxidados, sendo esta a forma mais estável (esmeraldina). A figura 2.2 ilustra a estrutura da polianilina e a letra y corresponde às unidades oxidadas e $y-1$ corresponde às unidades reduzidas. Este valor pode variar entre zero e um e é possível fazer uma correspondência com as formas

anteriormente referidas, tendo a leucoesmeraldina um valor de y igual a zero, a pernigranilina um y igual a um e, por fim, a esmeraldina um y com o valor 0,5. [19]

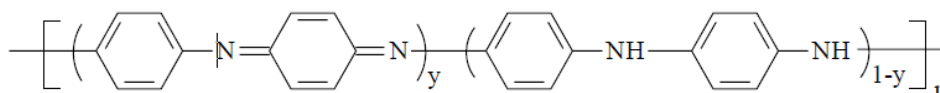


Figura 2.2 Estrutura da polianilina para diferentes estados de redução e oxidação (adaptado de [19]).

Estas três formas são isolantes, mas pode ocorrer uma reação em meio ácido, por exemplo ácido clorídrico, levando à formação de um sal através de uma reação de protonação que irá melhorar a condutividade da polianilina.

2.2.3. Óxido de grafeno

O grafeno é constituído por uma única camada plana de átomos de carbono firmemente compactados e, por apresentar um conjunto de propriedades onde se destacam uma excelente condutividade elétrica, elevada resistência mecânica, flexibilidade e estabilidade química, tem um grande potencial em aplicações como dispositivos eletroquímicos, em armazenamento de energia ou biossensores.

O óxido de grafeno é um derivado do grafeno que apresenta semelhantes propriedades mecânicas, diferindo deste último devido à camada de átomos de carbono ser coberta aleatoriamente por outras moléculas como grupos hidroxilo (OH). É um isolante elétrico, sendo necessária a sua redução química (transformação em óxido de grafeno reduzido através da remoção dos grupos funcionais de oxigénio) para que conduza eletricamente. [20], [21]

Em 2011, investigadores estudaram a citotoxicidade do óxido de grafeno e provaram que esta depende da dose aplicada e do tempo de exposição. Se utilizado em doses elevadas, pode provocar apoptose e diminuição de adesão celular, estando ainda por estudar alguns métodos que possam atenuar estes efeitos. No entanto, o OG pode ser utilizado em doses pequenas, verificando-se que numa concentração inferior a 20 $\mu\text{g/ml}$, não exibe toxicidade para células (fibroblastos humanos) com uma percentagem de sobrevivência das mesmas superior a 80%. Por outro lado, se a concentração de OG for superior a 50 $\mu\text{g/ml}$ existe uma forte diminuição da sobrevivência celular. [22]

2.3. Eletrólito

Como eletrólitos, foram testadas soluções de SBF (do inglês *Simulated Body Fluid*), dada a sua semelhança em concentração de sais com o plasma sanguíneo e soluções de glucose com várias concentrações. A preparação das soluções encontra-se no Anexo A.

2.3.1. Glucose

A glucose ($C_6H_{12}O_6$) é um carboidrato (monossacarídeo) que contém seis átomos de carbono. A glucose é considerada um aldeído pois contém grupos CHO e a sua estrutura é a mais estável das aldoses de seis carbonos, formando um anel do tipo piranose. Cada um dos carbonos tem uma ligação a grupos hidroxilo, exceto um deles que tem uma ligação a outro carbono, que por sua vez está ligado a outro grupo hidroxilo, como se pode observar na figura 2.3. [23]

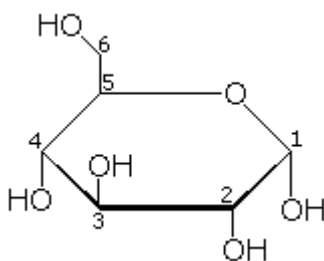


Figura 2.3 Estrutura da glucose (adaptado de [23]).

Esta molécula é bastante importante na biologia, estando presente no metabolismo dos seres vivos onde é uma fonte de energia para as células e atua como intermediário metabólico. Nas plantas, é um dos principais produtos da fotossíntese e auxilia na respiração celular. No corpo humano, tem uma concentração normal no sangue entre 70 mg/dL e 100 mg/dL mas pode ser muito maior para pessoas que sofram de diabetes. Depois de oxidada através do metabolismo, a glucose produz dióxido de carbono, água, alguns compostos de nitrogénio e energia que virá a ser utilizada pelas células. Não necessita de ser digerida, dada a sua importância como fonte de energia para o organismo. [24]

Capítulo 3. Métodos experimentais

Neste capítulo estão presentes os métodos, os materiais e os respetivos procedimentos realizados para o desenvolvimento do biodispositivo proposto. Assim, são apresentadas as seguintes etapas: produção das membranas e sua caracterização; desenvolvimento de elétrodos leves e flexíveis para a biobateria; e por fim, caracterização elétrica e eletroquímica dos dispositivos produzidos através de ensaios de Voltametria Cíclica.

3.1. Produção e otimização das membranas de acetato de celulose

As membranas de Acetato de Celulose para suporte dos elétrodos e separador para os mesmos foram produzidas por eletrofiação. Esta técnica permite a obtenção de membranas porosas, de elevada área superficial, possibilitando a troca iónica entre os elétrodos. É um processo de baixo custo, de fácil execução e reprodutibilidade.

3.1.1. Eletrofiação

A eletrofiação caracteriza-se por ser um método simples que se baseia nas interações eletrostáticas e produz fibras, na ordem dos micrómetros ou nanómetros, de uma grande variedade de polímeros. [25] As fibras, por terem diâmetros tão pequenos, permitem que as membranas formadas por estas tenham determinadas características tais como uma grande área superficial, elevada porosidade e um bom desempenho mecânico. [26] Dadas as suas propriedades, as membranas produzidas por esta técnica são utilizadas na indústria têxtil, podem funcionar como filtros e, dependendo da biocompatibilidade do polímero utilizado, podem ser úteis na engenharia de tecidos para a fabricação de *scaffolds* ou para um sistema de libertação controlada de fármacos.

3.1.1.1. Processo

A fabricação das fibras produzidas por eletrofiação baseia-se no estiramento uniaxial de um jato proveniente de uma solução polimérica na presença de um campo elétrico. Para a realização desta técnica são necessários os seguintes equipamentos: uma fonte de alta tensão, uma bomba de infusão para controlar o caudal, uma seringa que irá conter a solução polimérica, com uma agulha e, finalmente, um coletor onde serão depositadas as fibras. A agulha deverá estar ligada à fonte de tensão e o coletor deverá ser ligado à terra.

Inicialmente é ligada a bomba de infusão para ser definido um caudal com que a solução irá sair da seringa, adequado ao polímero utilizado e ao resultado pretendido. Seguidamente aplica-se uma tensão elétrica (normalmente de 10 kV a 30 kV) que originará um campo elétrico entre a agulha e o coletor. [25] Assim que a tensão elétrica aplicada atinge um determinado valor crítico, a repulsão eletrostática supera a tensão superficial e ocorre a formação de um jato de solução que irá percorrer o espaço entre a agulha e o coletor. Durante este percurso, a solução evapora e apenas o polímero é depositado no coletor resultando uma membrana composta por fibras na escala dos micrómetros ou nanómetros, como se vê na figura 3.1. [26]

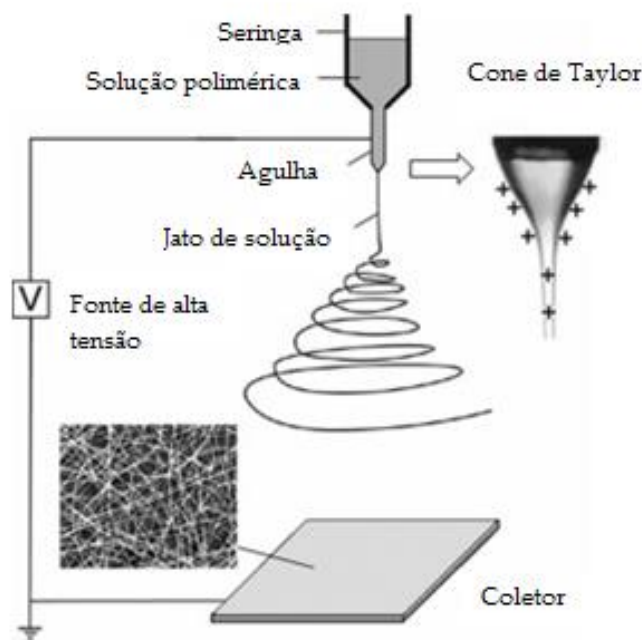


Figura 3.1 Ilustração esquemática da técnica de eletrofiação (adaptado de [25]).

3.1.1.2. Controlo da morfologia das fibras – parâmetros de eletrofiação

O diâmetro e a morfologia das fibras obtidas por eletrofiação são influenciados por vários parâmetros que podem depender das propriedades da solução polimérica utilizada, mas também

das condições ambientais e das condições escolhidas durante o processo, como a tensão aplicada, caudal e distância da agulha ao coletor. Também as propriedades da solução, como a viscosidade e a condutividade são determinantes para o diâmetro das fibras formadas. Se a viscosidade for demasiado elevada, formam-se fibras com maior diâmetro e pode até não existir o estiramento da solução pois as forças de coesão entre as moléculas são maiores. Se a viscosidade for demasiado baixa (pouca concentração do polímero) podem ser depositadas apenas gotas no coletor. Relativamente à condutividade da solução, quanto maior esta for, menor será o diâmetro das fibras seja menor pois aumenta a força de repulsão na superfície do jato. Além disso, é necessário seleccionar um solvente adequado à solubilidade do polímero, tendo em conta a sua volatilidade. Se o solvente escolhido for muito volátil, este pode evaporar até mesmo antes de se iniciar o processo de eletrofiação, conduzindo à solidificação da solução ainda na agulha, ou pelo contrário, se o solvente for pouco volátil, este pode não evaporar antes de o jato chegar ao coletor levando à fusão das fibras. [27]

Por outro lado, as condições do processo que mais influenciam são a tensão aplicada, a distância da agulha ao coletor, o caudal e o diâmetro da agulha. Se a tensão elétrica for demasiado elevada, a forma da gota que está na ponta da agulha é alterada e pode não ser formado o cone de Taylor, resultando num jato pouco estável e na formação de contas juntamente com as fibras. É importante ter em conta que quanto maior a tensão elétrica aplicada, mais finas serão as fibras. Em relação à distância da agulha ao coletor, se esta for demasiada, o campo elétrico formado diminui e pode não existir a formação de um jato de solução. Se esta for demasiado pequena, pode não ser suficiente para que haja evaporação do solvente e apenas chegam gotas de grandes dimensões ao coletor. Se o caudal, ou seja, o fluxo a que a solução é expelida da agulha, for maior, também o diâmetro das fibras vai ser maior e poderão ser criadas contas no coletor devido a uma excessiva acumulação de solução na ponta da agulha. Aplicando-se também o inverso, pois se o caudal for menor, também o será o diâmetro das fibras e poderá existir mesmo uma interrupção no jato como consequência de uma quantidade insuficiente de solução na ponta da agulha. Por último, o diâmetro da agulha irá influenciar da mesma maneira o diâmetro das fibras. [25]

É essencial controlo das condições ambientais no decorrer do processo, como a humidade e a temperatura, pois estas influenciam gravemente a criação das fibras, principalmente a humidade, sendo necessário um controlo constante da mesma dentro de um intervalo restrito dependente do polímero utilizado. Uma humidade elevada pode impedir a evaporação do solvente e permitir a deposição de gotas no coletor.

Procedimento experimental

Para uma otimização da produção das membranas é de extrema importância determinar quais os melhores parâmetros a utilizar na técnica de eletrofiação. Desta forma, foi realizado um estudo onde foram variadas as seguintes condições: concentração da solução, tensão aplicada, distância da agulha ao coletor e caudal.

Durante esta etapa foram preparadas soluções com diferentes concentrações de 5%, 8%, 10%, 12% e 14% (m/m) de acetato de celulose ($M_w \approx 200,000$ *Sigma Aldrich*) nos solventes acetona (*AnalaR Normapur*) e dimetilacetamida (*Honeywell Riedel-de Haën*), na proporção 2:1, respetivamente. As soluções foram colocadas em agitação magnética durante 24 horas.

O equipamento de eletrofiação utilizado é constituído por uma fonte de alta tensão (*Glassman High Voltage, inc*), uma bomba infusora (*Kid Scientific*), uma seringa (*Injekt 1 ml da B|Braun*) e uma agulha (calibre 21 da ITEC). Foi colocada uma folha de papel de alumínio no coletor para a deposição. Na figura 3.2 é possível observar o esquema de montagem do equipamento.

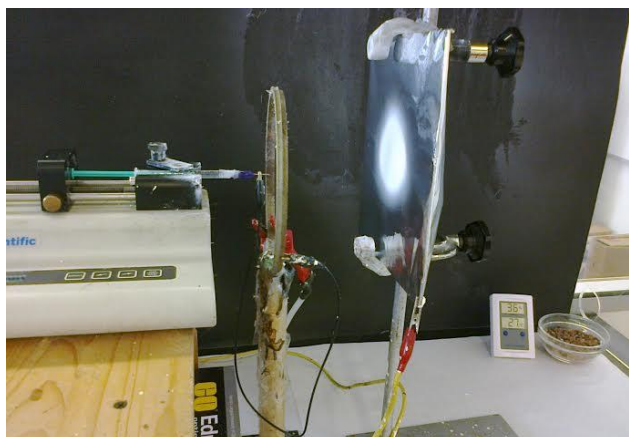


Figura 3.2 Ilustração do equipamento de eletrofiação e deposição de fibras de AC no coletor.

A solução é introduzida na seringa e, no caso de existir ar residual, este é removido. Seguidamente é colocada a agulha na seringa e esta é fixada na bomba infusora, onde é definido o diâmetro da mesma e o caudal desejado. O coletor é disposto na direção da bomba infusora à distância pretendida e é ligado à terra. Por sua vez, a agulha é ligada à fonte de alta tensão que apenas é ativada em último lugar para dar início à deposição das fibras. Para a realização do estudo para obtenção de fibras isentas de defeitos foram variados, para cada uma das concentrações de solução referidas, os parâmetros que se encontram na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Parâmetros variados para a realização do estudo de eletrofiação

Tensão aplicada (kV)		Distância (cm)		Caudal (ml/h)		
15	20	10	15	0,1	0,2	0,4

Para a realização deste estudo, foram produzidas 60 amostras, num coletor fixo, cada uma com uma deposição de 20 minutos. No entanto, para a obtenção de uma boa membrana, para posterior utilização, é necessária uma eletrofiação de 4 horas a 5 horas. A humidade foi mantida entre 35% e 42% e a temperatura entre $21 \pm 0,1$ °C e $29 \pm 0,1$ °C pois verificou-se uma melhor deposição de fibras nestes intervalos.

3.2. Produção dos elétrodos

A produção dos elétrodos é uma das partes fundamentais do trabalho proposto, pois estes garantem uma produção de energia autónoma por parte das biobaterias. Os elétrodos devem ser flexíveis para se adaptarem da melhor forma à membrana que funciona como separador permitindo que o eletrólito penetre pela mesma e facilite o transporte iónico entre o cátodo e o ânodo.

Tendo em conta estes aspetos, foram produzidos elétrodos com materiais poliméricos através do revestimento das membranas de acetato de celulose com os mesmos. Os polímeros escolhidos foram a polipirrol e a polianilina, devido às suas propriedades condutoras, biocompatibilidade e fácil produção. Os métodos de revestimento das membranas tiveram como base trabalhos realizados anteriormente, [28] onde foi possível definir as quantidades de reagentes e tempos de polimerização mais favoráveis. Como alternativa aos elétrodos poliméricos, foi também estudada a utilização de óxido de grafeno reduzido.

3.2.1. Revestimentos com Polipirrol

Procedimento experimental

Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa com um volume total de 20 ml e com uma determinada concentração de pirrol (*Sigma Aldrich* e $M = 67,09$ g/mol). Esta solução foi colocada em agitação magnética durante 10 minutos e foi adicionada uma membrana de acetato de celulose à mesma. Após outros 10 minutos, foi então adicionado o agente oxidante cloreto de ferro (III), de modo a que a proporção entre agente oxidante e monómero seja de 2:1, respetivamente. Este tem como função oxidar os monómeros de pirrol conduzindo à libertação

de radicais livres e dando origem à criação de ligações covalentes e à consequente formação de cadeias de polipirrol. Na figura 3.3 podemos observar um esquema do procedimento descrito.

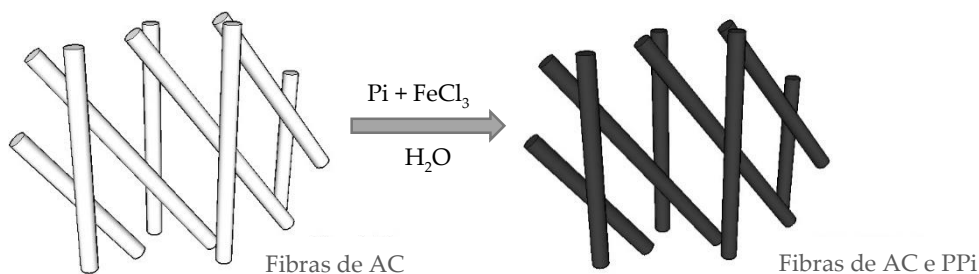


Figura 3.3 Esquema do procedimento do revestimento da membrana de AC com PPI.

A solução permaneceu em agitação magnética durante algum tempo e, após este período, a membrana foi retirada da solução, foi feita uma lavagem com água destilada e etanol e foi colocada a secar à temperatura ambiente, resultando numa membrana como a representada na figura 3.4.

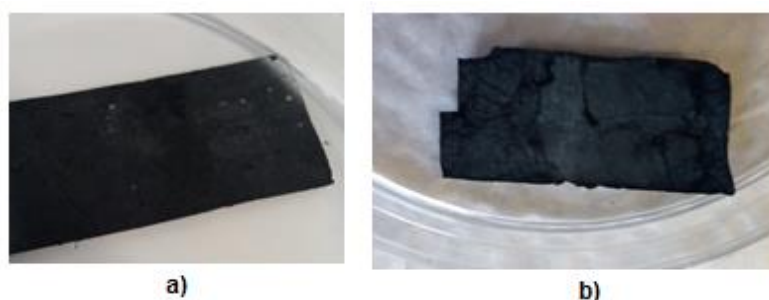


Figura 3.4 Revestimentos de polipirrol das membranas de AC (a e b).

3.2.2. Revestimentos com Polianilina

Procedimento experimental

Para os revestimentos das membranas com polianilina é necessário que a reação ocorra a baixas temperaturas e, para isso, esta decorreu na presença de gelo. Preparou-se uma solução com 10 ml de ácido clorídrico ($\text{HCl} = 1\text{M}$) onde foi adicionada a anilina (*Sigma Aldrich* e $M = 67,09 \text{ g/mol}$), a membrana de AC e deixou-se em agitação magnética durante 1 hora. Foi preparada outra solução com 10 ml de HCl e de persulfato de amónia (agente oxidante), para que a proporção entre agente oxidante e monómero seja de 2:1, respetivamente. Esta solução foi lentamente acrescentada à primeira solução com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e manteve-se em agitação durante alguns minutos. O esquema do procedimento encontra-se na figura 3.5.

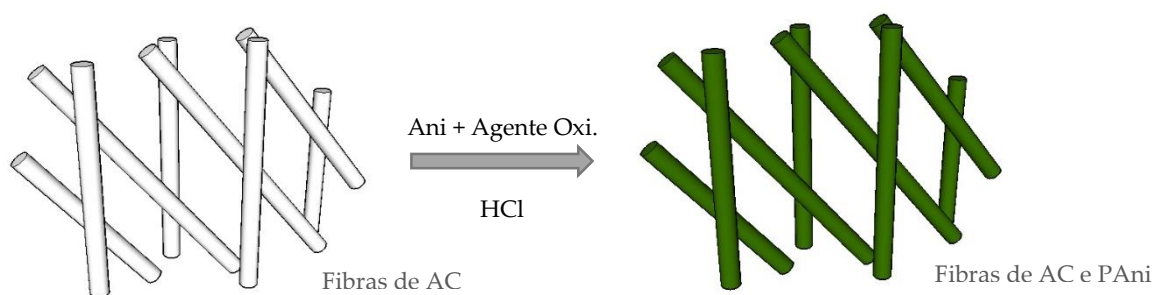


Figura 3.5 Esquema do procedimento do revestimento da membrana de AC com PANi.

Tal como nos revestimentos referidos anteriormente, a membrana foi sujeita a uma lavagem com água destilada e etanol e secou à temperatura ambiente, como podemos ver na figura 3.6.

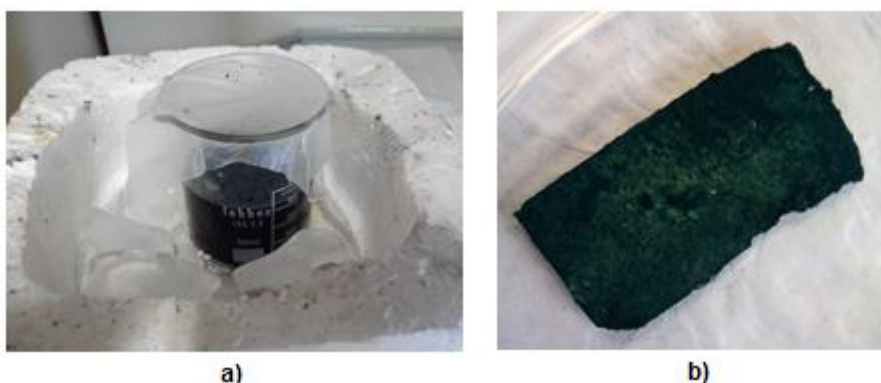


Figura 3.6 a) Solução de polianilina em gelo produzida para os revestimentos das membranas de AC; b) Membrana revestida por polianilina.

3.2.3. Produção de membranas com óxido de grafeno reduzido

Como alternativa aos elétrodos poliméricos, foi feito um estudo para avaliar a viabilidade do óxido de grafeno como um possível eletrodo. Ao contrário do grafeno, o OG é um isolante elétrico, sendo necessária a sua redução, que consiste na remoção dos grupos funcionais de oxigénio, através de agentes redutores.

Foram feitas dispersões com diferentes concentrações de óxido de grafeno, dada a sua insolubilidade nos solventes utilizados, através do processo de sonicação com uma sonda de ultrassons. Posteriormente foi adicionado o polímero acetato de celulose para a realização de eletrofiação com o objetivo de serem obtidas membranas de acetato de celulose com óxido de grafeno incorporado. Por fim, a redução foi realizada através de vapores, numa câmara adequada para o efeito, sendo utilizada a hidrazina como agente redutor.

Procedimento experimental

O óxido de grafeno utilizado foi gentilmente cedido por outros alunos do Departamento de Ciência dos Materiais da FCT/UNL e foi produzido pelo método de *Hummers* modificado a partir de grafite. Foram preparadas soluções com concentrações de 10% e 12% (m/m) de acetato de celulose nos solventes acetona e DMAc, na proporção 2:1, respetivamente. Para a solução de 10% de AC foi adicionado 1% (da massa do polímero) de óxido de grafeno e para a concentração de 12% de AC foram preparadas soluções de 1% e 2% de óxido de grafeno.

O OG foi submetido a um processo de sonicação, através de uma sonda de ultrassons (*Hielscher* UP400S) apenas num dos solventes, a DMAc, por apresentar uma menor taxa de evaporação. Colocou-se o frasco com a solução a ser sonicada numa tina de vidro com gelo para evitar o sobreaquecimento do mesmo e selecionou-se um pulso contínuo (Amplitude=100%, Cycle = 1). Posteriormente foi adicionado o polímero, a acetona e a solução permaneceu em agitação magnética durante 24 horas. Realizou-se eletrofiação das soluções referidas, com uma duração de 4 horas, tendo em conta os seguintes parâmetros: 20 kV, 15 cm de distância da agulha ao coletor e caudal de 0,2 ml/h para as soluções com 1% de OG e 0,15 ml/h para a solução com 2% de OG (observou-se uma melhor formação de fibras para este valor).

Por fim, para a redução do óxido de grafeno, recorreu-se a uma câmara de vapores, como a representada na figura 3.7, em a), onde foram colocados cerca de 5 ml de hidrazina. A membrana foi colada na tampa da respetiva câmara e efetuou-se um estudo da influência do tempo de exposição aos vapores, onde foram selecionados tempos entre 12 horas e 48 horas para todas as membranas. Simultaneamente testou-se o mesmo procedimento mas com o aquecimento das câmaras de vapores a uma temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ num banho de óleo durante 1 hora ou 2 horas.

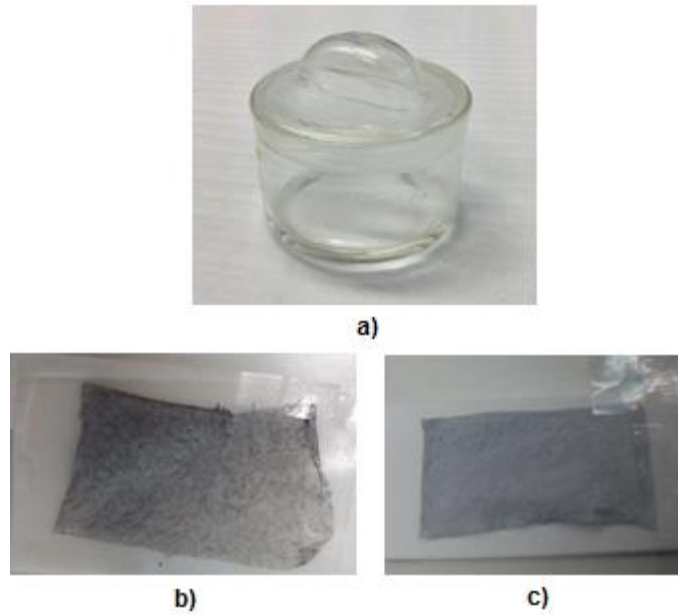


Figura 3.7 a) Câmara de vapores utilizada para a redução do óxido de grafeno presente nas membranas; b) Membrana com 2% de OG reduzido na câmara de vapores com hidrazina a uma temperatura de 40°C, durante 2 horas; c) Membrana com 1% de OG reduzido na câmara de vapores com hidrazina e sem temperatura, durante 12 horas.

3.3. Caracterização da solução

3.3.1. Viscosimetria

Considerando que um fluido seja dividido num número infinito de camadas, a viscosidade de um fluido (gás ou líquido) a uma dada temperatura pode ser definida como uma resistência interna à movimentação de diferentes camadas em relação a outras desse mesmo fluido. Quanto mais elevada for esta resistência, maior será a viscosidade e menor será a velocidade a que o fluido se movimenta.

Quando um fluido é submetido a uma determinada força por unidade de área, as diferentes camadas sofrem um atraso na movimentação de umas em relação a outras e é originado um gradiente de velocidade na direção perpendicular à força aplicada. As camadas centrais apresentam uma maior velocidade, ao contrário das camadas periféricas que, teoricamente, possuem uma velocidade nula. A equação de Newton para a viscosidade é apresentada seguidamente onde a força por unidade de área é conhecida como tensão de corte, τ , e o gradiente de velocidade corresponde à taxa de corte, (dv/dx) .

$$\tau = \eta \frac{dv}{dx} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde dx representa a distância infinitesimal entre duas camadas de um fluido, dv a diferença de velocidade entre elas e η a viscosidade. [29]

A determinação da viscosidade de soluções poliméricas pode ser realizada com o auxílio de um viscosímetro. É comparado o tempo gasto por uma solução ao escorrer por um capilar com o tempo gasto pelo solvente utilizado. Os tempos de escoamento da solução e do solvente podem ser calculados através das equações 3.2 e 3.3.

$$t_{\text{solvente}} = \frac{\eta_{\text{solvente}}}{\rho_{\text{solvente}}} \quad \text{Equação 3.2}$$

$$t_{\text{solução}} = \frac{\eta_{\text{solução}}}{\rho_{\text{solução}}} \quad \text{Equação 3.3}$$

Tendo em conta que a viscosidade relativa, avalia o quanto a viscosidade da solução é maior relativamente à do solvente e é obtida por $\eta_{\text{relativa}} = \frac{\eta_{\text{solução}}}{\eta_{\text{solvente}}}$ e, considerando que, em muitas soluções poliméricas, $\rho_{\text{solução}}/\rho_{\text{solvente}} \approx 1$, então a viscosidade relativa poderá depender apenas da razão dos tempos.[30]

$$\eta_{\text{relativa}} \approx \frac{t_{\text{solução}}}{t_{\text{solvente}}} \quad \text{Equação 3.4}$$

É possível obter o ganho de viscosidade da solução na presença do polímero através da viscosidade específica,

$$\eta_{\text{esp}} \approx \frac{\eta_{\text{solução}} - \eta_{\text{solvente}}}{\eta_{\text{solvente}}} = \frac{t_{\text{solução}} - t_{\text{solvente}}}{t_{\text{solvente}}} \quad \text{Equação 3.5}$$

Construindo um gráfico de η_{esp}/C em função das diferentes concentrações (C) e, extrapolando para um valor de concentração igual a zero, determina-se o valor da viscosidade intrínseca $[\eta]$. [31] É escolhida uma aproximação linear, representada pela equação seguinte,

$$\frac{\eta_{\text{esp}}}{c} = [\eta] + k.C \quad \text{Equação 3.6}$$

Onde k é o declive da reta do gráfico de η_{esp}/C em função das diferentes concentrações (C). Huggins mostrou que um gráfico de k em função de $[\eta]^2$ é linear e passa pela origem, desenvolvendo a equação,

$$\eta_{\text{esp}}(C) = [\eta]C + k_H([\eta]C)^2 + \dots \quad \text{Equação 3.7}$$

Sendo k_H o coeficiente de Huggins. O produto da viscosidade intrínseca e da concentração $[\eta]C$ é conhecido como o número de Berry (Be). Este permite definir o valor de concentração de polímero que se pode utilizar de modo a que sejam produzidas fibras sem defeitos. Se existir enovelamento das cadeias poliméricas, $Be > 1$ e se as cadeias não se sobrepuserem, $Be \leq 1$. Podemos definir um valor de concentração crítica a partir do qual existe sobreposição das cadeias poliméricas, C^* . [32]

$$C^* \approx \frac{1}{[\eta]} \quad \text{Equação 3.8}$$

Procedimento experimental

Utilizou-se um viscosímetro *Ubbelohde* *AVS 400* da empresa *Schott Gerate* para a determinação da viscosidade específica da solução de acetato de celulose e este método consistiu na introdução de várias soluções com diferentes concentrações de acetato de celulose (de 0,002 g/ml até 0,006 g/ml) num capilar. Mediu-se o tempo de escoamento para cada uma das soluções a uma temperatura entre 29,9 e $30,7 \pm 0,1$ °C. Cada medida foi repetida cinco vezes, com uma precisão de $\pm 0,01$ s e fez-se uma média das mesmas. A partir destes tempos de escoamento das soluções e do tempo de escoamento do solvente, é possível determinar a viscosidade específica.

Foi preparada uma solução de 0,006 g/ml e foram feitas diluições sucessivas para a preparação das restantes. As soluções foram colocadas, cada uma por sua vez, num capilar semelhante ao representado na figura 3.8 e este foi mantido em vácuo para permitir a suspensão da solução. Seguidamente, foi adicionada alguma pressão para que a solução escoasse pelo capilar e foi medido o tempo que a solução levou a percorrer as duas marcas assinaladas na figura.

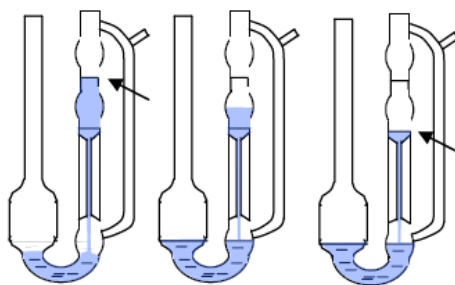


Figura 3.8 Diagrama esquemático do funcionamento do viscosímetro (adaptado de [30]).

3.4. Caracterização das membranas

Para um correto funcionamento da biobateria é essencial analisar em pormenor cada componente da mesma, verificar se a sua produção foi realizada da forma adequada e garantir que a mesma é resistente o suficiente para uma utilização com qualidade e durabilidade.

Foi utilizada a microscopia eletrónica de varrimento para observar se a membrana produzida por eletrofiação possui fibras com os diâmetros desejados, indicando também, no caso dos elétrodos, se o material depositado cobre uniformemente as fibras. Para a caracterização das membranas foi calculada a taxa de inchamento e avaliada a degradação das mesmas em PBS através do cálculo da perda de massa. Por fim, analisou-se a citotoxicidade pela realização de uma cultura celular.

3.4.1. Propriedades morfológicas e estruturais

3.4.1.1. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrônica de varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*, SEM) permite uma análise mais detalhada da superfície do material a ser observado. Em comparação com a microscopia ótica normal, o SEM tem uma maior profundidade de campo, o que faz com que a maior parte da superfície da amostra seja focada qualquer que seja a rugosidade da superfície. Apresenta também uma maior ampliação (até um milhão de vezes, ao contrário do microscópio ótico que tem uma ampliação de mil vezes) com uma resolução de um nanômetro. [33]

O princípio de funcionamento consiste num feixe de elétrons (cátodo a temperaturas elevadas), onde os elétrons são emitidos e, posteriormente, são acelerados através de um ânodo. [34] O feixe de elétrons tem energias entre 2 keV a 1000 keV e é focalizado por lentes condensadoras, num ponto focal com algumas décimas de nanômetros. Em determinados pontos do percurso do feixe de elétrons, este é desviado por campos controlados por um gerador de varrimento, fazendo com que o feixe incida na amostra de uma forma controlada, escolhida pelo utilizador (em espiral, em círculos ou quadrados, por exemplo). Os elétrons incidentes interagem com a amostra e são emitidos elétrons secundários na superfície da mesma que irão ser coletados por um detetor de elétrons. Também podem ser emitidos elétrons de Auger, raios-X, radiação eletromagnética e fótons. [33]

O sinal de cada detetor é enviado para um monitor que é sincronizado com o feixe de elétrons e a ampliação corresponde à razão entre o comprimento do monitor e o comprimento do percurso do feixe na amostra. [34]

Procedimento experimental

Prepararam-se pequenas amostras das membranas a analisar e foram coladas sobre fita de carbono num suporte metálico. De seguida, o porta-amostras foi revestido por uma fina camada de ouro de modo a evitar a acumulação de campos eletrostáticos. Para além disso, aumenta a quantidade de elétrons secundários detetados, o que leva a uma melhor relação sinal-ruído e a qualidade da imagem é melhorada significativamente. [35]

Os diâmetros das fibras produzidas foram determinados com o auxílio do *software* ImageJ®. Efetuaram-se 50 medições para cada imagem obtida por SEM e foram feitos os histogramas respetivos para uma análise da distribuição dos diâmetros.

3.4.1.2. Taxa de inchamento

A taxa de inchamento das membranas pode ser calculada através da equação 3.9.

$$\text{Taxa de inchamento (\%)} = \frac{M - M_i}{M_i} \times 100 \quad \text{Equação 3.9}$$

Onde M_i é a massa das amostras após um tempo i de imersão e M corresponde à massa inicial das amostras, antes de serem imersas. [36]

Procedimento experimental

Selecionaram-se 3 amostras de membranas de acetato de celulose que foram introduzidas em caixas de *Petri* e imersas em água destilada. As membranas foram retiradas em intervalos de tempo definidos previamente, que variaram entre 10 minutos e 7360 minutos (aproximadamente 5 dias) e foi calculada a taxa de inchamento para cada uma das amostras.

Tabela 3.2 Representação dos minutos em que ocorreu a pesagem das membranas, após a imersão das mesmas em água destilada

Intervalos de tempo (minutos)												
10	20	30	45	75	120	180	280	400	520	4300	5980	7360

3.4.2. Degradação das membranas

Na degradação polimérica ocorre uma alteração irreversível na estrutura do material, nomeadamente a perda de algumas propriedades como a massa molar, composição química, resistência mecânica e perda de integridade (fragmentação).

Nos polímeros, pode ocorrer erosão volúmica ou erosão superficial. Na erosão volúmica, a degradação ocorre simultaneamente em todo o volume do material. A velocidade de erosão não é constante, podendo existir pouca erosão ao início e, mais tarde, esta pode iniciar-se espontaneamente, levando a uma perda de massa mais retardada. Na erosão superficial, a perda de material apenas acontece à superfície e a velocidade de erosão é mais constante, logo a perda de massa verifica-se desde o início.

Os fatores que podem influenciar a degradação de um polímero são os seguintes:

- ✓ Estabilidade química do polímero (velocidade a que pode ocorrer a degradação hidrolítica das ligações poliméricas, levando à criação de monómeros);

- ✓ Baixa cristalinidade (se o polímero apresentar uma baixa cristalinidade, existe uma maior penetração de água, levando a uma degradação hidrolítica mais rápida);
- ✓ Elevada porosidade;
- ✓ Elevada hidrofilia da cadeia polimérica (o polímero degrada-se mais rapidamente devido à maior facilidade de penetração das moléculas de água). [37]

O acetato de celulose é um polímero hidrofílico, semi-cristalino e, no estudo de degradação em causa, poderá ocorrer uma degradação hidrolítica da cadeia polimérica devido à presença de água na solução de PBS.

Procedimento experimental

Para a avaliação da degradabilidade, prepararam-se pequenas amostras das membranas de acetato de celulose e das membranas de AC revestidas com polipirrol e com polianilina, procedeu-se à sua colocação em frascos com a mesma quantidade de uma solução salina (PBS) e foram mantidos numa estufa a 37°C, de forma a fazer uma simulação do meio fisiológico. Para que o volume da solução em cada frasco não sofresse alterações e para evitar a reprodução de microrganismos, o meio foi renovado semanalmente. Durante esta etapa, os frascos foram lavados com água destilada para evitar uma acumulação de sais e foi colocada solução de PBS, cuja preparação se encontra descrita no Anexo B.

As membranas foram pesadas e verificou-se qual a sua espessura antes da imersão. Quando retiradas, foi feita uma lavagem das mesmas com água destilada para retirar os sais da solução para que a massa final não fosse influenciada, foi feita a pesagem das mesmas e verificou-se qual a sua espessura.

O estudo teve a duração de 3 meses e a quantidade de membranas retiradas em cada mês encontra-se descrita na tabela 3.3. Foram realizadas 3 amostras para cada membrana, totalizando 66 membranas (figura 3.9).

Tabela 3.3 Quantidade de membranas retiradas em cada mês durante o estudo de degradação

<u>Membranas</u>	Dezembro	Janeiro	Fevereiro
AC	3	5	8
AC e PPI	1	1	1
AC e PAni	1	1	1



Figura 3.9 Amostras do estudo de degradação no interior da estufa, que permaneceu a 37°C durante 3 meses.

Perda de massa

A biodegradabilidade das membranas pode ser avaliada pela perda de massa das mesmas, dada pela equação 3.10.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{M_i - M_d}{M_i} \times 100 \quad \text{Equação 3.10}$$

Onde M_d é a massa das amostras após um tempo i de imersão depois de secarem e M_i corresponde à massa inicial das amostras, antes de serem imersas. [36]

3.4.3. Citotoxicidade

Avaliou-se a biocompatibilidade das membranas de acetato de celulose e das membranas de AC revestidas com PPI e com PANi (elétrodos poliméricos) através de testes de citotoxicidade. Utilizou-se um método indireto, ilustrado na figura 3.10, onde as membranas ficam em contacto apenas com um meio de cultura que é posteriormente colocado nos poços que contêm as células. Usaram-se células *Vero* oriundas do tecido epitelial de uma espécie de primata para os testes de citotoxicidade.

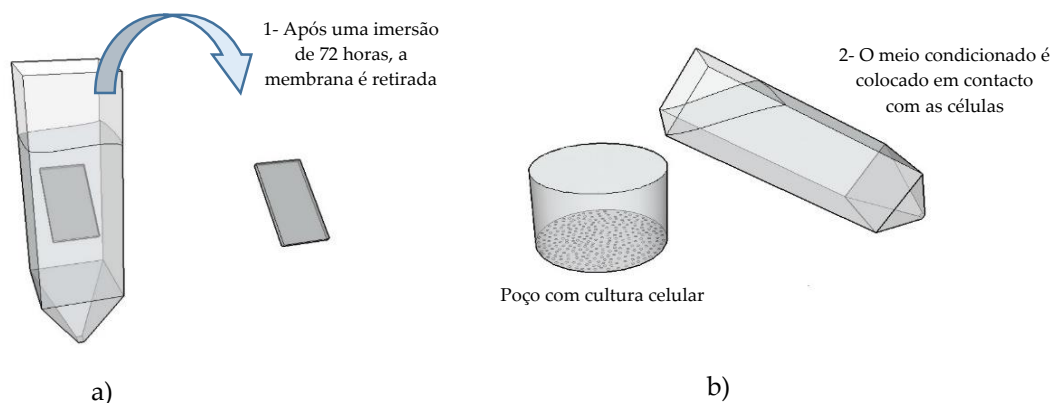


Figura 3.10 Método utilizado para os testes de citotoxicidade: a) A membrana é retirada do meio de cultura após imersão e b) O meio de cultura que esteve em contacto com a membrana é colocado nos poços com a cultura celular.

O procedimento empregue neste estudo teve as seguintes fases principais:

- ✓ Preparação da cultura celular;
- ✓ Adição do meio condicionado (em contacto com as membranas) à cultura celular;
- ✓ Determinação da citotoxicidade das membranas através da leitura de absorvâncias.

Todo o procedimento experimental foi efetuado na câmara de segurança microbiológica, presente no laboratório de Engenharia de Células e Tecidos, do Departamento de Física, da FCT/UNL. Todos os materiais e as luvas utilizadas foram esterilizados com isopropanol a 70% de modo a evitar a contaminação das amostras.

As amostras utilizadas foram pesadas, esterilizaram-se com etanol e foi feita uma lavagem com PBS antes da imersão no meio de cultura (DMEM). A membrana de AC tinha uma massa inicial de 7,7 mg, a membrana de AC revestida com PPi apresentava 7,5 mg e a membrana de AC revestida com PANi, 11,52 mg. As membranas foram adicionadas a 2 ml de meio e foram colocadas numa estufa a 37°C durante aproximadamente 72 horas. Os procedimentos para preparação da cultura celular, adição do meio condicionado e leitura de absorvâncias encontram-se no anexo C.

3.5. Caracterização elétrica e eletroquímica

Para a caracterização elétrica e eletroquímica das membranas é importante verificar a viabilidade dos elétrodos utilizados, determinando qual a sua condutividade. Foram também realizados ensaios eletroquímicos, dado que o princípio de funcionamento das baterias se associa a processos eletroquímicos, tendo como base a produção de energia a partir de reações de oxidação-redução. Para o estudo destes processos foi realizada a técnica de voltametria cíclica para diferentes elétrodos e eletrólitos, tal como a determinação da corrente de circuito aberto.

3.5.1. Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica (em *Siemens* por centímetro, S/cm) indica-nos a capacidade de um material conduzir corrente elétrica e é dada pela equação 3.11.

$$\sigma = \frac{L}{A \times R} \quad \text{Equação 3.11}$$

A resistência é representada por R , a área da membrana atravessada pela corrente é dada por A e L corresponde ao seu comprimento. Para o cálculo da condutividade é necessário determinar qual o valor da resistência do material em causa que pode ser obtida através de gráficos de Corrente-Tensão (I - V). O inverso do declive da reta do gráfico corresponderá ao valor da resistência, tendo em conta a lei de Ohm, $V = RI$. [38]

Procedimento experimental

Colocaram-se pequenas amostras de formato retangular numa lâmina e foi aplicada cola de prata nas extremidades das mesmas para funcionarem como elétrodos para a realização das medições. É importante que a cola de prata das duas extremidades não entre em contacto para evitar a existência de curto-circuitos.

Utilizaram-se duas pontas de prova de um microprovador, que foram posicionadas sobre os elétrodos de cola de prata, como ilustra a figura 3.11. Este encontra-se ligado a um *Semiconductor Parameter Analyser* 4145B, da *Hewlett-Packard* que, por sua vez, é controlado por um computador. Foi aplicada uma gama de potencial elétrico de -1V a 1V às amostras (com um tipo de varrimento linear) e foram medidos os valores de corrente elétrica respetivos. Introduziu-se um intervalo entre medidas de 50 mV e limitou-se a corrente a 100 mA. Realizaram-se 3 medições para cada amostra, cada uma com 40 valores de corrente medidos.

No cálculo da condutividade foi considerado o espaçamento entre elétrodos e a espessura da membrana, o que leva à obtenção de valores por defeito, pois a condutividade dá-se ao longo

das fibras e o espaçamento entre fibras é considerado como material que contribui para a condutividade. Para a obtenção de valores mais corretos, deveria considerar-se a condutividade das próprias fibras que seria possível através de AFM, que no entanto é uma técnica muito morosa e requer uma preparação especial para as amostras, portanto não foi possível a sua realização durante este trabalho. Assim, optou-se por obter uma estimativa do valor da condutividade, considerando o material um sólido compacto. No entanto, mesmo com um erro elevado é possível analisar a influência dos parâmetros no aumento ou diminuição do valor da condutividade.

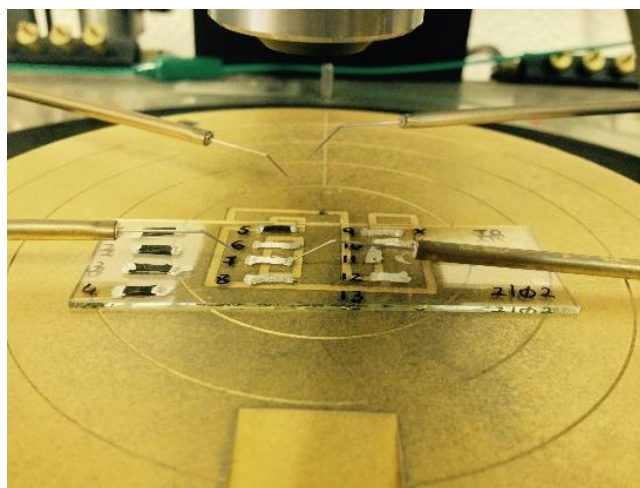


Figura 3.11 Amostras colocadas junto às pontas de prova do microprovador para a realização das medições.

3.5.2. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica que permite analisar as reações eletroquímicas [39] obtendo-se informação sobre a termodinâmica de processos de oxidação-redução e de reações acopladas a processos eletroquímicos.

O processo decorre numa célula eletroquímica que pode ser composta por dois ou três elétrodos. Normalmente utilizam-se três elétrodos: o eletrodo de trabalho (E-T), o contra-elétrodo (C-E) e o eletrodo de referência (Ref.). É medida a corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o contra-elétrodo quando se induz uma diferença de potencial entre os mesmos.

No eletrodo de trabalho ocorre a reação de transferência de eletrões, o eletrodo de referência mantém o potencial constante entre medidas e o contra-elétrodo garante uma situação potencioestática. O contacto elétrico entre os três elétrodos ocorre numa solução com concentrações elevadas de sais inertes que é responsável por manter uma boa condutividade elétrica no meio, uma força iónica ajustada e um pH constante.

Na voltametria varia-se o potencial (V) e o parâmetro a ser medido é a corrente (I), logo um voltamograma consiste no registo da corrente em função do potencial, isto é, $I = f(V)$. É necessária a ocorrência de reações de oxidação e redução para acontecer transferência de eletrões e, assim, uma corrente elétrica, que corresponde ao número de eletrões que atravessa determinada secção por unidade de tempo. Existem várias reações que decorrem no elétrodo e estas iniciam-se com a transferência de massa, ou seja, a transferência da espécie presente na solução para a superfície do elétrodo; depois tem de existir uma transferência de eletrões na superfície do elétrodo (transferência de carga) e, por fim, têm lugar reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de eletrões. [40]

Na voltametria de varrimento linear, o potencial que é aplicado no elétrodo de trabalho varia linearmente ao longo do tempo. No varrimento de tensão, quando o potencial atinge valores mais negativos e, existindo redução dos compostos presentes em solução, este dá origem ao aparecimento de picos de corrente que são proporcionais à concentração dos compostos respetivos. Na voltametria cíclica, depois de atingido este valor e quando já não existem reduções, há um varrimento inverso do potencial até ao valor inicial, o que provoca a oxidação das espécies que foram formadas durante a redução dos compostos acima mencionados. Se o sistema de oxidação-redução permanecer em equilíbrio durante o varrimento de potencial, o processo é reversível. Os picos de potencial (E_p) e os picos de corrente (i_p) estão representados na figura 3.12, que representa um voltamograma cíclico. [39], [40]

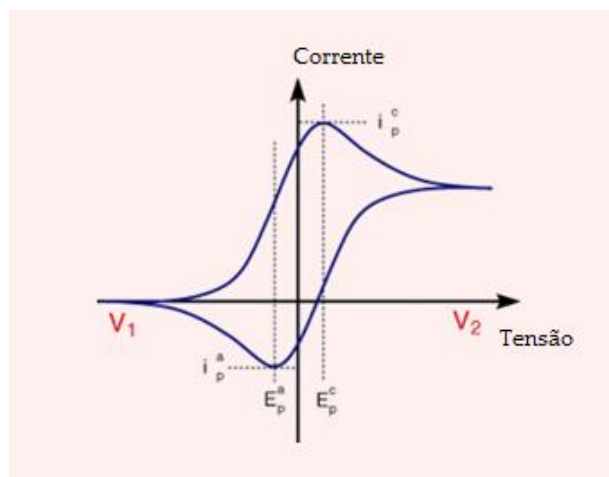


Figura 3.12 Voltamograma Cíclico (adaptado de [39])

Procedimento experimental

O dispositivo a testar (membrana separadora e elétrodos), com cerca de 1 cm^2 de área, foi colocado entre duas redes de carbono que foram ligadas aos elétrodos de trabalho e contra-elétrodo, na montagem representada na figura 3.13.



Figura 3.13 a) Representação de uma das baterias utilizadas, com elétrodos de polipirrol e de polianilina e b) Montagem utilizada para os ensaios eletroquímicos.

Para a caracterização das propriedades elétricas e eletroquímicas das baterias, utilizou-se um potenciostato da *Gamry Instruments* (Reference 3000). Escolheu-se uma configuração de dois elétrodos, ou seja, o elétrodo de referência encontra-se ligado ao contra-elétrodo para formarem apenas um elétrodo e o potencial é medido entre este conjunto e o elétrodo de trabalho.

Adicionou-se cerca de 0,1 ml de eletrólito sobre o dispositivo e selecionou-se a aplicação *Cyclic Voltametry* no programa do potenciostato da *Gamry Instruments*. Foram realizadas várias medições para diferentes combinações de elétrodos e eletrólitos e selecionaram-se os parâmetros seguintes: limites de varrimento (-1V a 1V); velocidade de varrimento (25, 40, 80 e 100 mV.s^{-1}); Ciclos (10); corrente máxima (10 mA).

3.5.3. Determinação da tensão de circuito aberto

Para a determinação da tensão de circuito aberto utilizou-se a mesma montagem representada anteriormente pela figura 3.13, na voltametria cíclica, mas os elétrodos não se encontram ligados para que exista um circuito aberto, onde o valor da corrente é igual a zero. Com esta configuração, é possível medir a tensão de circuito aberto, V_{oc} , que indica o valor máximo de tensão atingido pela bateria, avaliando a contribuição dos diferentes elétrodos e eletrólitos para a mesma. Selecionou-se a aplicação *Open Circuit* no programa do potenciostato da *Gamry Instruments* e foram realizados ensaios com 1 hora de duração.

Capítulo 4. Apresentação e discussão de resultados

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer do trabalho desenvolvido. Inicialmente, foi feito um estudo com o fim de determinar quais os melhores parâmetros a utilizar no processo de eletrofiação para a obtenção de membranas de acetato de celulose mais adequadas. Foram testadas condições como a tensão elétrica aplicada, distância da agulha ao coletor, caudal e determinou-se também, quais os limites de concentração de acetato de celulose que a solução deveria conter para resultarem membranas compostas por fibras com uma distribuição de diâmetros controlada e sem defeitos. Seguidamente realizaram-se testes de caracterização das membranas para avaliar o seu desempenho como constituintes de um dispositivo eletroquímico. Por fim, caracterizaram-se eletricamente os eletrodos e verificou-se o comportamento eletroquímico da biobateria com todos os seus componentes.

4.1. Caracterização da solução

4.1.1. Viscosidade intrínseca

De forma a caracterizar a solução de AC, com solventes acetona e DMAc (proporção 2:1, respetivamente), determinou-se a viscosidade específica através do tempo de escoamento de soluções com diferentes concentrações. Na tabela 4.1 são apresentados os valores médios dos tempos de escoamento (média de 5 medições) e o valor da viscosidade específica, obtidos a uma temperatura de cerca de 30°C.

Tabela 4.1 Valores adquiridos para os tempos de escoamento do solvente puro (t_0), das diferentes concentrações de solução (t_i) e cálculo da viscosidade específica (η_{sp})

Concentração de AC (mg.ml ⁻¹)	t_0 (s)	t_i (s)	η_{sp}	η_{sp}/C (ml.g ⁻¹)
0	177,81	---	---	---
2	---	237,77	0,34	168,62
3	---	276,19	0,55	184,44
4	---	301,70	0,70	174,20
5	---	349,45	0,97	193,09
6	---	389,04	1,19	198,00

A viscosidade intrínseca pode ser calculada ao extrapolar, num gráfico de η_{sp}/C em função das diferentes concentrações (C), para uma concentração igual a zero.

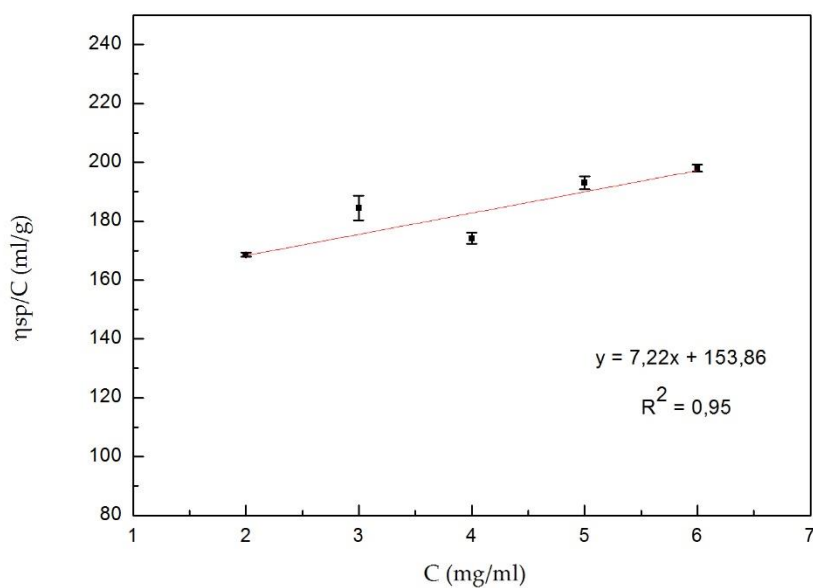


Figura 4.1 Gráfico da viscosidade específica em função da concentração e respetiva reta de regressão linear para o cálculo da viscosidade intrínseca.

Como é possível observar na figura 4.1, ao extrapolar o valor da concentração para zero, obtém-se o valor da viscosidade intrínseca, $[\eta]$, correspondente a 153,86 ml.g⁻¹. A concentração crítica (C^*) representa o valor a partir do qual ocorre enovelamento das cadeias poliméricas, existindo uma alteração nas propriedades de escoamento do fluido. Abaixo deste valor, as cadeias poliméricas encontram-se livres e a solução está em regime diluído, onde a viscosidade

específica apresenta um comportamento linear com o aumento da concentração (verificado na figura 4.1). [32] Neste sistema, a concentração crítica ($C^* = 1/[\eta]$) tem o valor de $6,50 \text{ mg.ml}^{-1}$, o que significa que a concentração de polímero na solução deverá ser superior a este valor para a realização de eletrofiação.

4.2. Produção e otimização das membranas de acetato de celulose

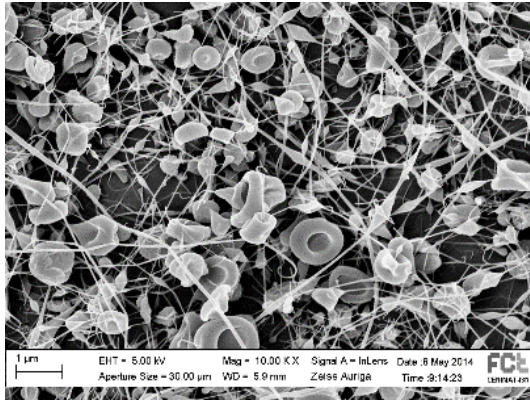
4.2.1. Morfologia das fibras produzidas por eletrofiação

Prepararam-se soluções de acetato de celulose nos solventes acetona e DMAc (proporção 2:1, respetivamente) com as concentrações referidas na tabela 4.2. Além do estudo da influência deste parâmetro na morfologia das fibras resultantes, também se testaram outros parâmetros como o caudal ($0,1$; $0,2$ e $0,4 \text{ ml.h}^{-1}$), a tensão (15 kV , 20 kV) e a distância (10 cm , 15 cm), sendo feita uma combinação entre todos. Os diâmetros médios de algumas amostras selecionadas, após observação num microscópio eletrónico de varrimento (MEV) e cálculo dos diâmetros médios (50 medições para cada amostra) com o programa de processamento de imagem ImageJ®, encontram-se na tabela 4.2.

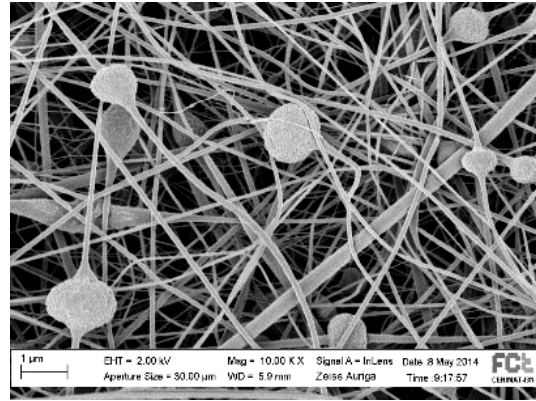
Tabela 4.2 Diâmetros médios para as diferentes condições utilizadas durante a eletrofiação

Concentração %(m/m)	Parâmetros de eletrofiação			Diâmetro médio (nm)
	Tensão (kV)	Distância (cm)	Caudal (ml.h^{-1})	
5	20	15	0,1	63 ± 29
			0,2	103 ± 17
8	20	15	0,2	96 ± 23
			0,4	87 ± 29
10	20	15	0,2	130 ± 55
			0,4	193 ± 57
12	20	15	0,2	325 ± 139
	20	10		256 ± 143
	15	10	0,4	403 ± 155
	20	10		357 ± 175
14	20	15	0,1	493 ± 182
			0,2	476 ± 186

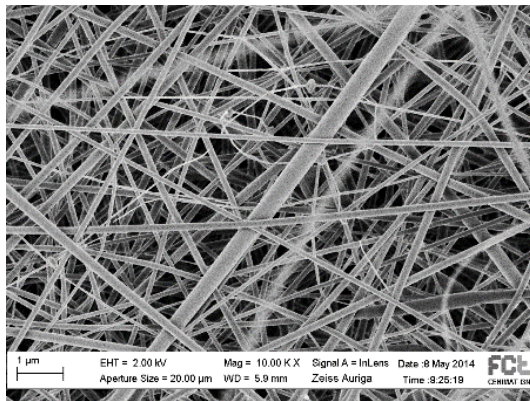
A morfologia das membranas produzidas foi analisada quanto à uniformidade do diâmetro das fibras e à existência de imperfeições através das imagens obtidas por SEM. Na figura 4.2 estão representadas algumas das imagens para as diferentes concentrações. As restantes imagens e respetivos histogramas com a distribuição dos diâmetros encontram-se em anexo.



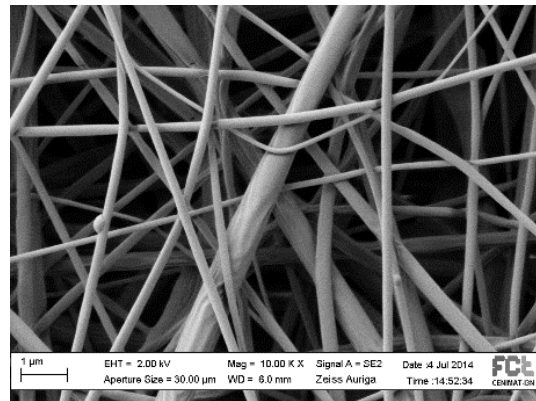
a)



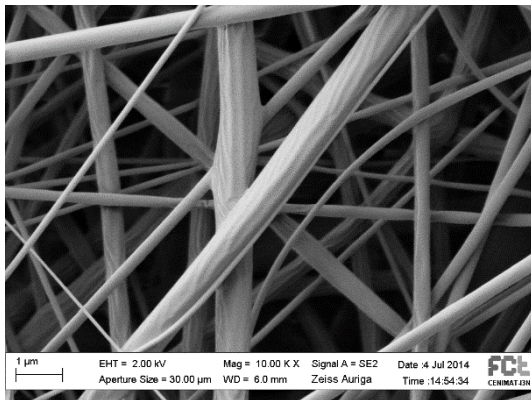
b)



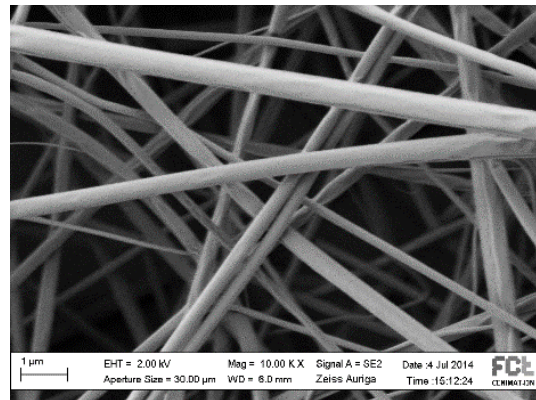
c) 10%



d) 12%



e)



f)

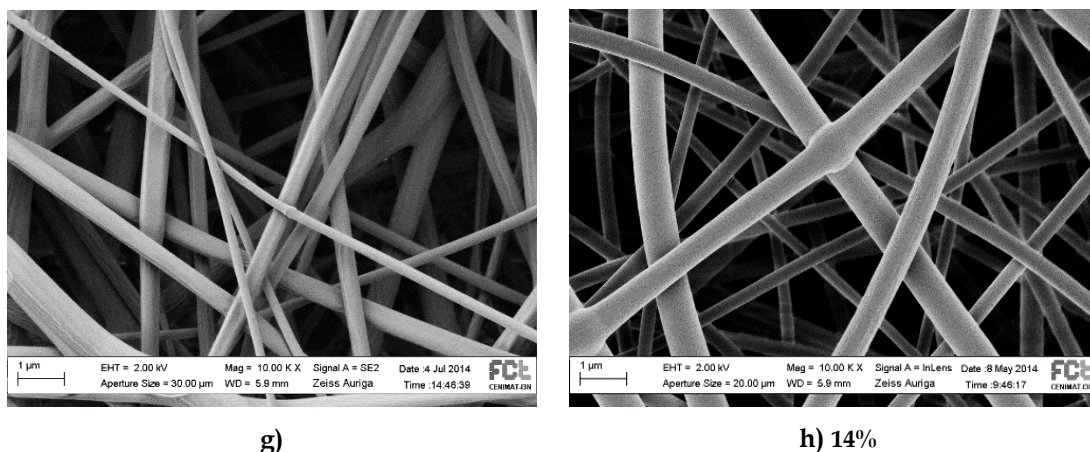


Figura 4.2 Imagens de SEM das nanofibras de AC produzidas por eletrofiação: a) Membrana de 5% de AC (20kV, 15 cm, 0,1 ml.h⁻¹); b) 8% AC (20kV, 15 cm, 0,2 ml.h⁻¹); c) 10% AC (20kV, 15 cm, 0,2 ml.h⁻¹); d) 12% AC (20kV, 10 cm, 0,2 ml.h⁻¹); e) 12% AC (20kV, 10 cm, 0,4 ml.h⁻¹); f) 12% AC (20kV, 15 cm, 0,2 ml.h⁻¹); g) 12% AC (15kV, 10 cm, 0,4 ml.h⁻¹) e h) 14% AC (20kV, 15 cm, 0,1 ml.h⁻¹).

As amostras que apresentam contas ou fibras fundidas foram excluídas e selecionaram-se as amostras com uma distribuição mais uniforme de diâmetros e com ausência de defeitos.

A partir da análise das imagens de SEM apresentadas na figura 4.2, observa-se que a morfologia das fibras altera-se com o aumento da concentração do polímero. Para as concentrações mais baixas (5 e 8% (m/m)), verificam-se um número bastante elevado de contas e pouca formação de fibras. Na imagem c), para uma concentração de 10% (m/m), o número de contas diminui significativamente e existe uma boa formação de fibras, embora algumas ainda tenham diâmetros demasiado pequenos e não existe uma boa uniformidade dos mesmos. Com o aumento da concentração para 12% (m/m), em d), e), f) e g), existe um aumento no diâmetro médio das fibras e uma diminuição na dispersão destes. O mesmo é verificado para 14% (m/m), em h), porém já existe alguma fusão de fibras devido à incompleta evaporação do solvente.

Foi possível concluir que as membranas mais adequadas para a função de suporte e separador para a biobateria apresentam uma concentração de 12% (m/m) de acetato de celulose. De uma forma geral, após análise de todas as imagens e respetivos histogramas de distribuição de diâmetros, observa-se que a tensão elétrica de 20 kV, distância de 15 cm e caudal de 0,2 ml.h⁻¹ correspondem às melhores condições de produção. A amostra produzida com os parâmetros referidos encontra-se representada na imagem f) da figura 4.2 e o histograma dos diâmetros está presente na figura 4.3.

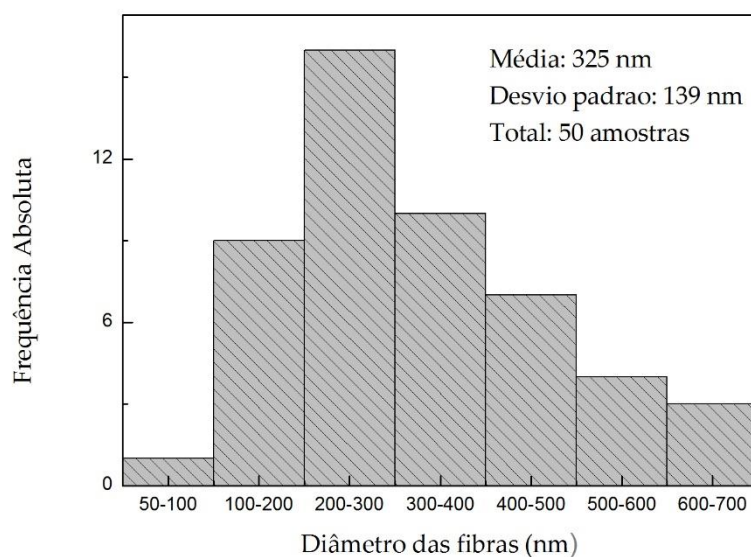


Figura 4.3 Histograma com a distribuição de diâmetros para as fibras produzidas a partir de eletrofiação (tensão de 20 kV, distância a 15 cm e um caudal de 0,2 ml.h⁻¹) com uma solução de concentração 12% (m/m) de AC.

A imagem f) da figura 4.2 mostra que as fibras produzidas nestas condições apresentam uma superfície regular e são homogêneas. Os diâmetros destas concentram-se entre os 200 nm e os 300 nm, como se pode observar no histograma da figura 4.3. As membranas devem conter fibras com o menor diâmetro possível (com ausência de defeitos) para que possuam uma boa porosidade e área superficial, determinantes na condução de iões entre os elétrodos.

4.2.2. Influência dos vários parâmetros no diâmetro médio das fibras

Os parâmetros da realização de eletrofiação têm um papel preponderante na morfologia das fibras produzidas. Como é possível observar na tabela 4.2, para a concentração de 12% (m/m) de AC, o diâmetro médio das fibras diminui com o aumento da tensão para 20 kV pois existe um maior estiramento da fibra, tornando-a mais fina. Já o aumento da distância entre a agulha e o coletor aumenta o diâmetro das fibras devido à diminuição do efeito do campo elétrico para distâncias maiores, provocando um estiramento menor nas fibras.

A influência do caudal e da concentração da solução podem ser observados no gráfico da figura 4.4, onde foram mantidos os outros parâmetros constantes.

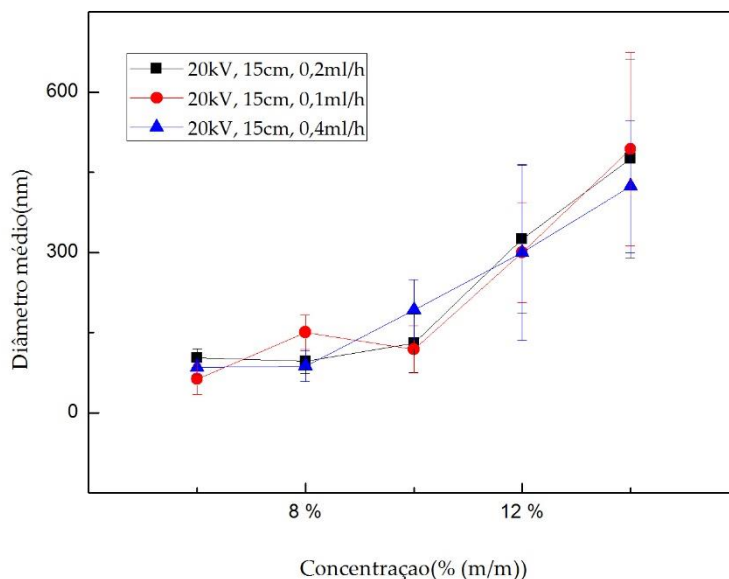


Figura 4.4 Influência da concentração de AC no diâmetro médio das fibras produzidas por eletrofiação.

De uma forma geral, seria de esperar que o diâmetro das fibras aumentasse com o aumento do caudal pois é expelida uma maior quantidade de solução mas verifica-se que não existe uma forte influência do caudal no diâmetro médio das fibras. Por vezes existe um aumento linear do diâmetro com o aumento do caudal, mas em algumas amostras isso não acontece e o diâmetro volta a diminuir.

Na figura 4.4, verifica-se que com o aumento da concentração existe um aumento do diâmetro médio para todas as condições apresentadas. O aumento da concentração implica uma maior viscosidade, o que provoca uma maior oposição das forças viscoelásticas ao estiramento do jato de solução. Para concentrações mais baixas existe um número mais elevado de moléculas de solvente para a quantidade de moléculas do polímero, o que leva a uma maior fluidez da solução ao sair da agulha podendo provocar a formação de contas e menor formação de fibras.

4.2.3. Número de Berry

O número de Berry permite-nos definir um intervalo para o qual são produzidas fibras sem defeitos e com um diâmetro adequado. Na tabela 4.3 encontram-se os números de Berry calculados para as diferentes concentrações de AC, tendo em conta o valor da viscosidade intrínseca, $[\eta] = 153,86 \text{ ml.g}^{-1}$, determinado anteriormente.

Tabela 4.3 Número de Berry para cada concentração de AC e respectivos diâmetros médios das fibras produzidas

% (m/m)	C (g.ml ⁻¹)	$[\eta]C$	Diâmetro médio (nm)
5	0,04	6,8	103 ± 17
8	0,07	11,2	96 ± 23
10	0,09	14,3	130 ± 55
12	0,11	17,5	325 ± 139
14	0,14	20,9	476 ± 186
16	0,16	24,4	525 ± 105

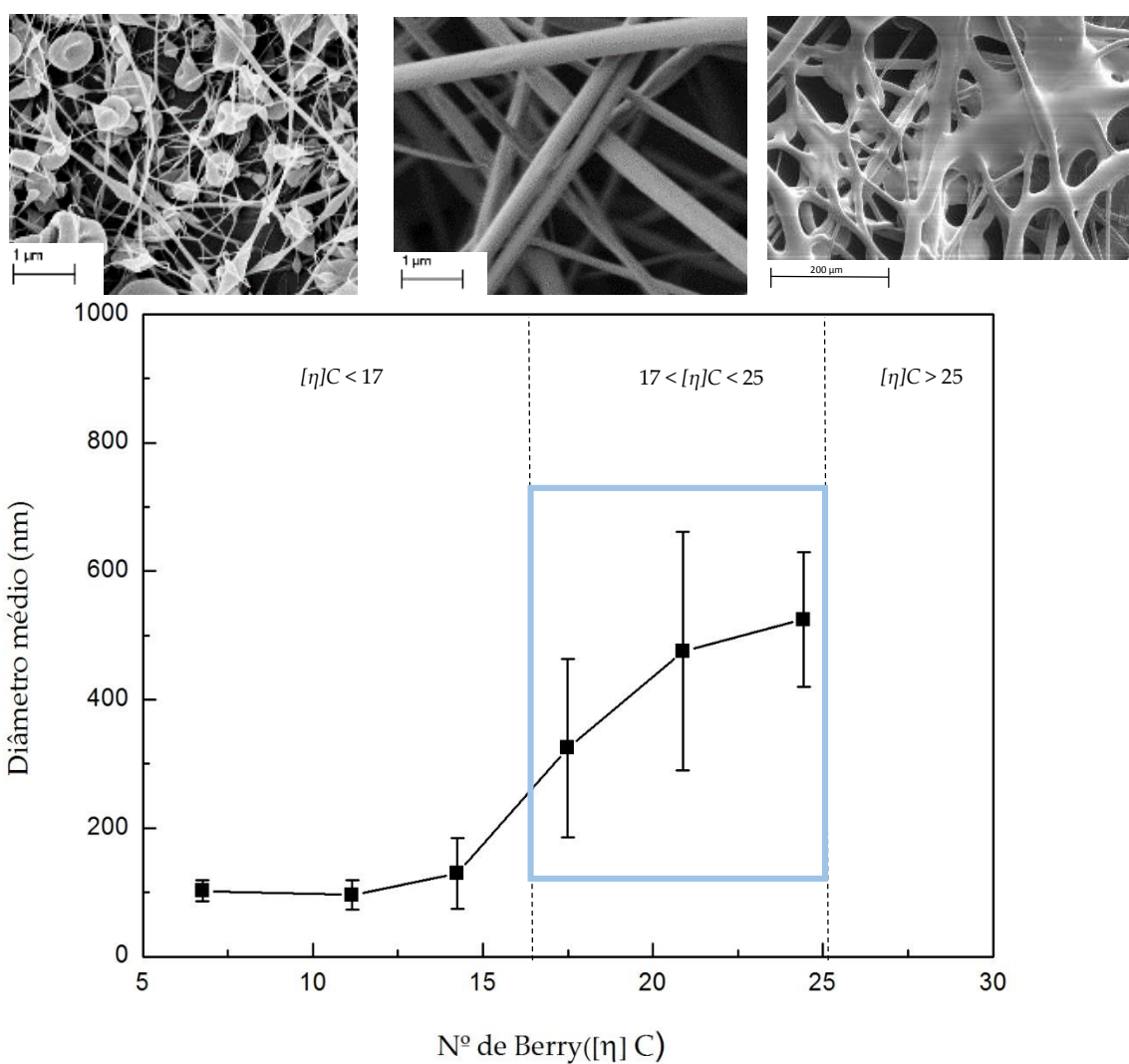


Figura 4.5 Gráfico do diâmetro médio das fibras em função do Número de Berry $[\eta]C$.

Neste sistema, o número de Berry está compreendido entre 17 e 25, que correspondem aos valores para os quais é possível produzir fibras isentas de defeitos. Para valores abaixo de 17 existe formação de contas e verifica-se uma distribuição de diâmetros pouco uniforme, por outro lado, para valores superiores a 25, ocorre total fusão de fibras. As fibras cujo número de Berry se encontra entre 17 e 25 possuem uma distribuição de diâmetros mais uniforme, o que leva a uma boa porosidade, área superficial e não apresentam contas nem fusões de fibras.

Como referido anteriormente, a solução com uma concentração de 12% (m/m) de AC é a mais adequada para a eletrofiação de fibras com diâmetros regulares, da ordem dos 325 nm, sendo esta a solução base para a produção das membranas utilizadas no decorrer de todo o trabalho.

O processo de eletrofiação decorreu durante 5 horas, obtendo-se espessuras medidas com uma craveira micrométrica para várias amostras em diferentes partes das membranas, com valores entre 30 μm e 50 μm para a zona periférica da membrana e valores entre 60 μm e 85 μm nas zonas centrais da mesma.

4.3. Caracterização das membranas produzidas

4.3.1. Taxa de inchamento

O gráfico seguinte representa uma média das taxas de inchamento de 3 membranas produzidas por eletrofiação, com uma solução de 12% (m/m) de acetato de celulose para vários tempos de medição até um total de 7360 minutos.

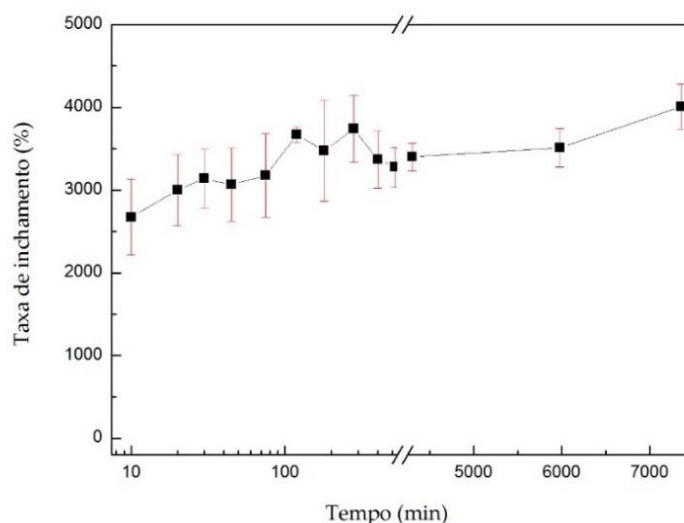


Figura 4.6 Gráfico da taxa de inchamento em função do tempo de imersão.

As amostras selecionadas apresentavam uma massa inicial de 20,2 mg (M1), 26,5 mg (M2) e 23,4 mg (M3). As espessuras iniciais foram, respetivamente, 61 μm , 85 μm e 67 μm . No gráfico da figura 4.6, é possível observar que as membranas atingem um ponto de saturação a partir das 5 horas (aproximadamente 300 minutos) de imersão. O valor máximo para a taxa de inchamento registado foi de 4007%, o qual se encontra dentro dos valores referidos na literatura. [36]

4.3.2. Degradação das membranas

O estudo da degradação das membranas e cálculo da respetiva perda de massa teve como objetivo avaliar o desempenho da biobateria em meio fisiológico e determinar a sua aplicabilidade na área da biomedicina. O gráfico seguinte representa uma média das perdas de massa de 3 membranas, sendo retiradas sempre 3 membranas em simultâneo para os tempos presentes no gráfico, num total de 94 dias (cerca de 3 meses).

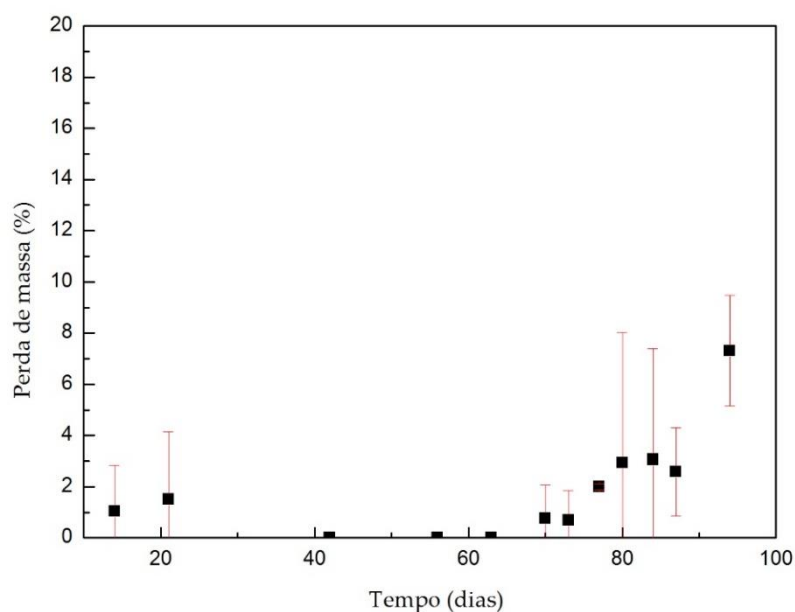


Figura 4.7 Gráfico da perda de massa das membranas de AC em função do tempo de imersão em PBS (a 37°C).

A partir do gráfico da figura 4.7 observa-se que existe uma ligeira perda de massa nos primeiros dias de imersão das membranas de AC em PBS (de 1,0% e de 1,5%), mas seguidamente esta não ocorre entre o dia 42º e o dia 63º de remoção das membranas do meio. A ligeira perda de massa inicial pode dever-se à reduzida massa das amostras (de $1,9 \pm 0,1$ mg a $3,2 \pm 0,1$ mg) e

espessura (de $30 \pm 1 \mu\text{m}$ a $37 \pm 1 \mu\text{m}$) comparativamente com as restantes amostras resultando numa degradação mais rápida. Também devido a este facto, poderão ter ocorrido erros durante a pesagem das mesmas devido à pouca precisão da balança para massas tão reduzidas.

A partir do 70º dia existe uma perda de massa gradual até um valor máximo de 7,3% relativamente à massa inicial que sugere que há uma erosão volúmica (a degradação ocorre simultaneamente em todo o volume do material). Se as membranas tiverem uma elevada área superficial e porosidade em relação ao seu volume, existe uma maior penetração das moléculas de água presentes na solução de PBS e estas irão degradar as membranas através de hidrólise da cadeia polimérica. Na figura 4.8 é possível observar várias imagens obtidas por SEM, de membranas retiradas em diferentes tempos de imersão.

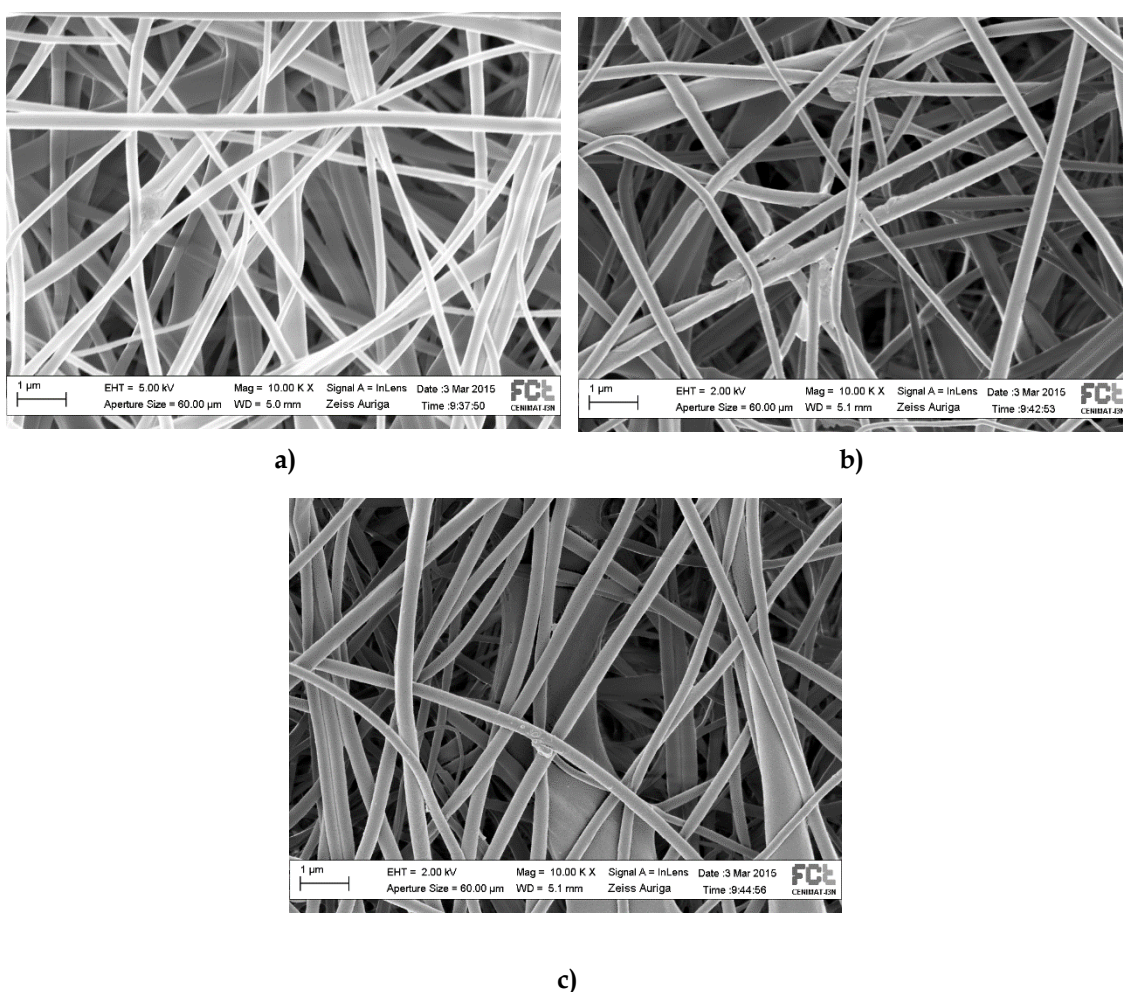


Figura 4.8 Imagens SEM das membranas sujeitas ao estudo de degradação: a) Membrana retirada na primeira semana de imersão em PBS; b) Membrana retirada após 73 dias de imersão e c) Membrana retirada após 94 dias de imersão (tempo total do estudo).

Apesar de não se registrar uma perda de massa significativa das membranas e a última membrana a ser retirada não apresentar sinais visíveis de degradação, sugerindo uma continuação do bom funcionamento da mesma, o estudo deveria ser prolongado para verificar se existe uma estabilização da perda de massa ao longo do tempo e, deste modo, averiguar a sua viabilidade em meio fisiológico.

O gráfico da figura 4.9 representa o estudo de degradação realizado para os elétrodos de membranas de AC revestidas com polipirrol e com polianilina. Estas membranas foram retiradas mensalmente e é apresentada uma média da perda de massa de 3 réplicas para cada ponto.

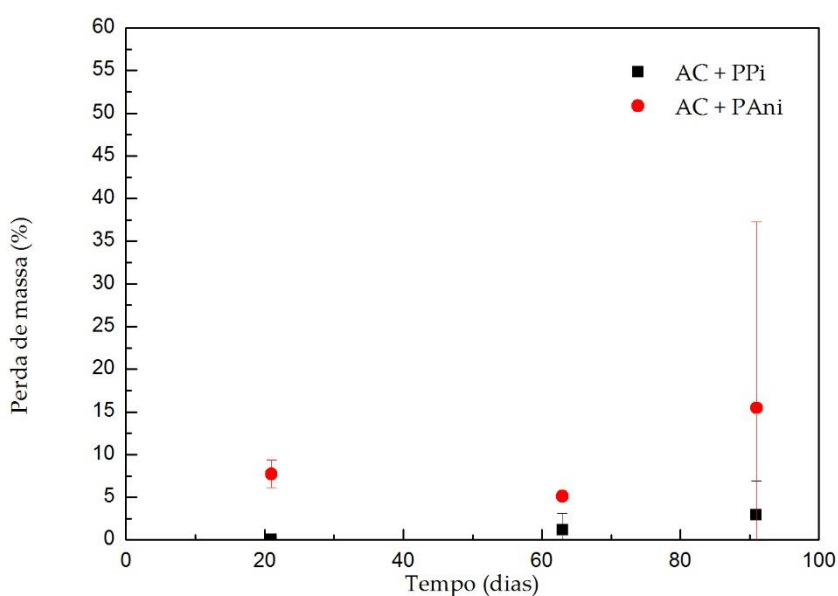


Figura 4.9 Gráfico da perda de massa das membranas de AC revestidas com polipirrol (a preto) e revestidas com polianilina (a vermelho) em função do tempo de imersão em PBS (a 37°C).

É notória uma perda de massa igualmente gradual nos elétrodos poliméricos, sugerindo também uma erosão em massa, com um máximo registado de perda de massa para a membrana de AC com polipirrol de 2,9% e de 15,5% para a membrana de AC com polianilina. Conclui-se que a polipirrol é mais resistente do que a polianilina.

Foram realizadas medições de condutividade elétrica para todas as membranas, antes e após o estudo de degradação (e após secagem das mesmas), para verificar se os elétrodos continuavam ou não a funcionar corretamente em meio fisiológico. Os resultados encontram-se na secção 4.4 tal como imagens obtidas em SEM, onde é apresentada uma conclusão mais aprofundada sobre a degradação sofrida pelos elétrodos poliméricos.

4.3.3. Citotoxicidade

Para uma melhor determinação da citotoxicidade das membranas de acetato de celulose e das membranas de AC revestidas com polipirrol e com polianilina, as células foram observadas num microscópio ótico e foi medida a absorvância relativa à resazurina e resofurina após 24 horas e 48 horas de contacto das células com o meio condicionado onde estiveram as membranas.

Os gráficos da figura 4.10 representam os dados obtidos por espectrofotometria relativos às absorvâncias detetadas da resazurina e da resofurina. Após a análise dos valores obtidos, estes foram normalizados em relação ao controlo negativo para uma melhor comparação dos resultados, obtendo-se valores entre 0 e 1. O valor da unidade corresponde aos valores normalizados obtidos para as células de controlo negativo, ou seja, para o meio sem citotoxicidade.

Após 24 horas, não é registada citotoxicidade por parte do meio que esteve em contacto com a membrana de AC. Por outro lado, regista-se uma citotoxicidade relativamente elevada para a membrana de AC com polianilina (0,4) e para a membrana de AC com polipirrol (0,5), indicando que cerca de metade das células permaneceram viáveis. O controlo positivo indica uma morte celular bastante elevada.

Para as 48 horas de contacto das células com o meio condicionado, verifica-se que a membrana de AC com polipirrol é a mais citotóxica, agravando a morte celular com o prolongamento do contacto do meio com as células. A membrana de AC com polianilina apresenta uma maior estabilidade na citotoxicidade.

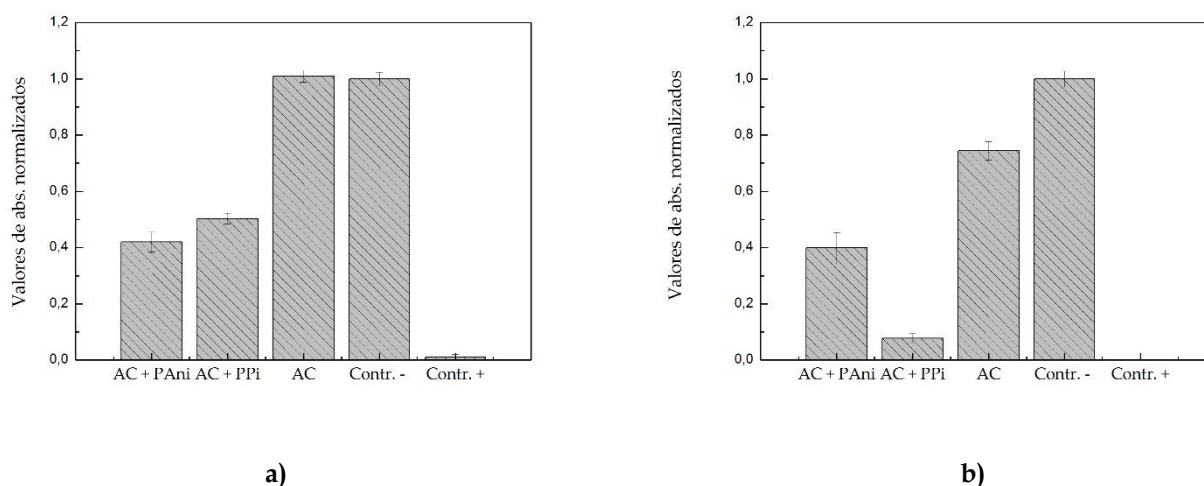


Figura 4.10 Valores de absorvância medidos após a) 24 horas e b) 48 horas de contacto das culturas celulares com os respetivos meios condicionados.

Na figura 4.11 estão representados todos os poços preparados para cada um dos meios condicionados. Os resultados anteriores podem ser confirmados pela observação da coloração dos poços. Os poços com uma coloração azul contêm uma maior quantidade de resazurina e os poços com uma coloração cor-de-rosa têm uma maior quantidade de resofurina (convertida pelas células metabolicamente ativas).

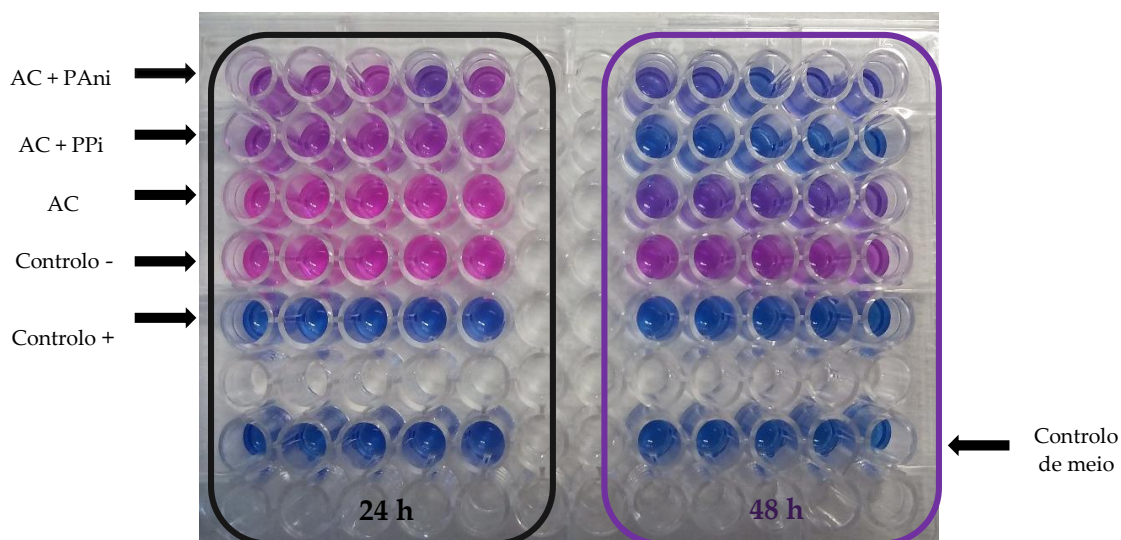


Figura 4.11 Montagem da placa de 50 poços para a cultura celular após a adição de resazurina (à esquerda após as 24 horas de contacto com o meio condicionado e à direita após 48 horas).

Estes valores não apresentam resultados favoráveis para a utilização das membranas revestidas com polianilina e com polipirrol em dispositivos implantáveis, visto que, segundo a norma ISO (10993-5), uma viabilidade celular acima de 80% em relação ao controlo negativo corresponde a uma ausência de citotoxicidade, valores entre 60% e 80% apontam para uma citotoxicidade ligeira e uma viabilidade entre 40% e 60% indica uma citotoxicidade moderada. [41]

As amostras foram esterilizadas antes da introdução no meio de cultura com etanol mas, no entanto, podem ter permanecido alguns subprodutos residuais resultantes da oxidação dos monómeros ou vestígios de agente oxidante, mesmo com uma lavagem das membranas após o revestimento (consultar anexo E). Os métodos de lavagem das membranas após os revestimentos deverão ser otimizados para diminuir a toxicidade das membranas. Por outro lado, é importante ter em conta que as membranas permaneceram algum tempo no meio de cultura (72 horas) em que este não foi renovado, algo que acontece em meio fisiológico, com a constante renovação dos fluidos corporais.

4.4. Caracterização elétrica e eletroquímica

4.4.1. Condutividade elétrica

4.4.1.1. Eléttodos poliméricos

Realizaram-se medições de condutividade elétrica (σ) para 6 membranas diferentes de acetato de celulose revestidas com polipirrol e para 7 membranas de AC revestidas com polianilina. Para cada uma das membranas foram realizadas 3 medições.

Na tabela 4.4 estão representadas as médias das condutividades para a polipirrol e para a polianilina, bem como os valores máximos e mínimos registados para cada.

Tabela 4.4 Condutividades elétricas para os eléctodos de polipirrol e polianilina

Eléttodos	σ (S.cm ⁻¹)	Valor máximo de σ (S.cm ⁻¹)	Valor mínimo de σ (S.cm ⁻¹)
<u>PPi</u>	$1,3 \times 10^{-1} \pm 1,1 \times 10^{-1}$	$3,5 \times 10^{-1}$	$4,0 \times 10^{-2}$
<u>PAni</u>	$8,5 \times 10^{-1} \pm 6,3 \times 10^{-1}$	2,2	$2,2 \times 10^{-1}$
σ AC não revestido (S.cm ⁻¹) = $7,2 \times 10^{-9} \pm 0,2 \times 10^{-9}$			

A condutividade elétrica também foi determinada para as membranas revestidas que sofreram o estudo de degradação (referido em 4.3.2) de forma a prever o seu funcionamento como eléctodos em meio fisiológico.

Tabela 4.5 Condutividades elétricas para os eléctodos de polipirrol e polianilina após o estudo de degradação

Eléttodos (após degradação)	σ (S.cm ⁻¹)		
	21 dias	63 dias	91 dias
<u>PPi</u>	$8,5 \times 10^{-7} \pm 0,5 \times 10^{-7}$	$7,6 \times 10^{-7} \pm 2,8 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-7} \pm 1,6 \times 10^{-7}$
<u>PAni</u>	$9,2 \times 10^{-7} \pm 3,3 \times 10^{-8}$	$2,3 \times 10^{-7} \pm 0,1 \times 10^{-7}$	$5,7 \times 10^{-8} \pm 1,4 \times 10^{-8}$

Os eléctodos poliméricos sofreram uma degradação da condutividade elétrica que vai diminuindo de forma gradual ao longo do estudo de degradação. Supõe-se que este facto pode dever-se à criação de ligações entre os fosfatos presentes na solução de PBS (utilizada para o estudo de degradação) às cadeias poliméricas ou à protonação/reprotonação das mesmas [42]. As imagens de SEM correspondentes às membranas revestidas antes e após o estudo da degradação encontram-se na figura 4.12.

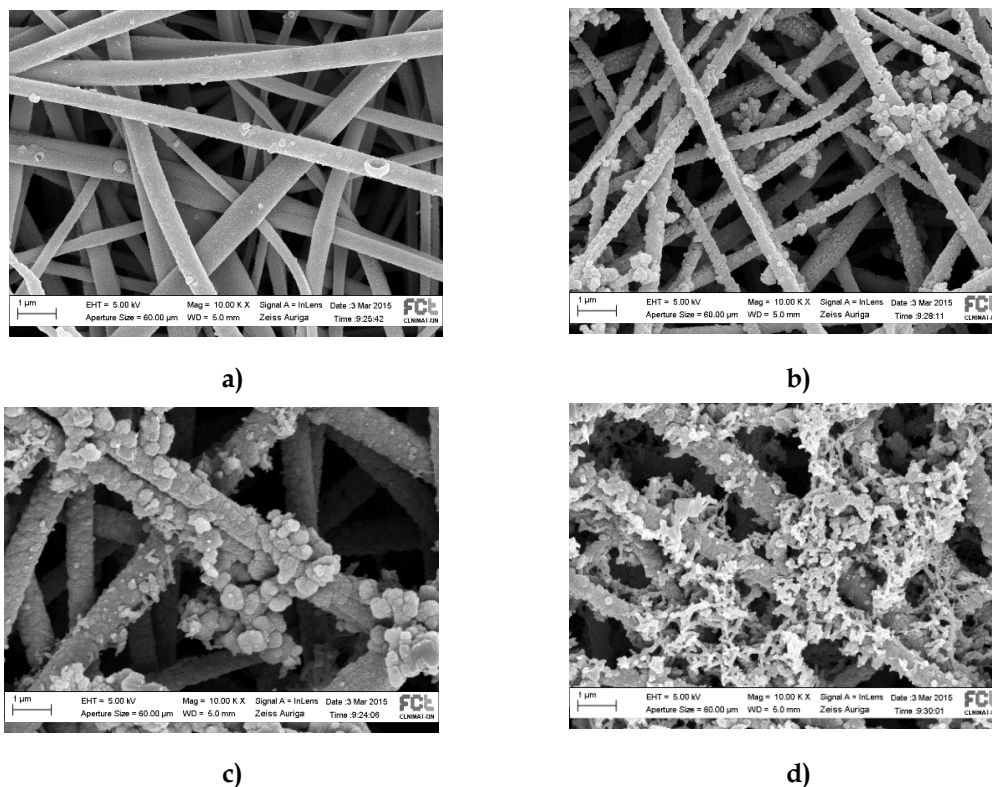


Figura 4.12 Imagens SEM referentes às amostras utilizadas para o estudo de degradação: a) Membrana de AC revestida com PPI antes do estudo; b) Membrana revestida com PPI após sofrer degradação; c) Membrana revestida com PANi antes do estudo; d) Membrana revestida com PANi após sofrer degradação.

4.4.1.2. Óxido de grafeno

Na tabela 4.6 apresentam-se as condutividades elétricas medidas para as várias membranas produzidas com diferentes concentrações de óxido de grafeno numa solução de 12% (m/m) de acetato de celulose para os vários tempos de redução. Foram feitas medições em 2 membranas para cada condição, cada uma com 3 réplicas.

Também foi determinada a condutividade elétrica para a membrana com 10% (m/m) de AC e 1% de OG (em relação à massa do polímero) para vários tempos de redução com vapores de hidrazina, contudo esta não consta na tabela seguinte pois, após observação ao microscópio, verificou-se pouca formação de fibras em comparação com as membranas de concentrações de 12% de AC. A título de exemplo, a condutividade para 18 horas de redução, foi de $1,3 \times 10^{-7} \pm 0,8 \times 10^{-7} \text{ S.cm}^{-1}$.

Tabela 4.6 Condutividades elétricas para várias horas de redução do óxido de grafeno

Eléttrodo de OG	$\sigma \text{ (S.cm}^{-1}\text{)}$		
	12 horas de redução	24 horas de redução	48 horas de redução
1% OG	$9,8 \times 10^{-7} \pm 0,6 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-7} \pm 0,1 \times 10^{-7}$	$5,4 \times 10^{-7} \pm 1,1 \times 10^{-7}$
2% OG	$1,3 \times 10^{-11} \pm 0,4 \times 10^{-11}$	$3,1 \times 10^{-7} \pm 1,6 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-6} \pm 0,2 \times 10^{-6}$

Tendo em conta: σ (S.cm⁻¹) 12% AC sem OG (24 horas na câmara de vap.) = $5,2 \times 10^{-9} \pm 3,1 \times 10^{-9}$

À exceção da membrana com 1% (m/m) de OG, para as 12 horas de redução, verifica-se um aumento da condutividade elétrica com o aumento do tempo de redução. A primeira membrana poderá apresentar um valor mais elevado devido a uma maior concentração de óxido de grafeno nas zonas das amostras selecionadas para esta medição. A membrana com 2% (m/m) de OG para as 48 horas de redução é a que apresenta um valor mais elevado de redução, com $1,7 \times 10^{-6}$ S.cm⁻¹. Como a hidrazina utilizada é bastante tóxica e pode degradar o polímero (acetato de celulose) não foram testados mais tempos de redução, no entanto este estudo revelou-se bastante promissor na redução do óxido de grafeno podendo ser posteriormente otimizado para uma melhor relação condutividade/resistência da membrana.

A tabela 4.7 representa o estudo realizado para a redução com vapores hidrazina a 40°C para vários tempos de redução na membrana de 2% (m/m) de OG.

Tabela 4.7 Condutividades elétricas para vários tempos de redução do óxido de grafeno a 40°C

<u>Eléttodos de OG</u>	σ (S.cm ⁻¹)	
	1 hora de redução	2 horas de redução
<u>2% OG</u>	$3,7 \times 10^{-8} \pm 0,91 \times 10^{-8}$	$6,3 \times 10^{-7} \pm 0,2 \times 10^{-7}$

Na figura 4.13 pode-se observar imagens de SEM para as membranas de 12% de AC (m/m) eletrofiadas com OG, após a redução com vapores de hidrazina. É notória alguma rugosidade à superfície das fibras, indicando a presença do óxido de grafeno reduzido. Na imagem b), correspondente à membrana com um maior tempo de redução, existe uma danificação e fusão das fibras, levando à formação de uma estrutura que se aproxima de uma rede.

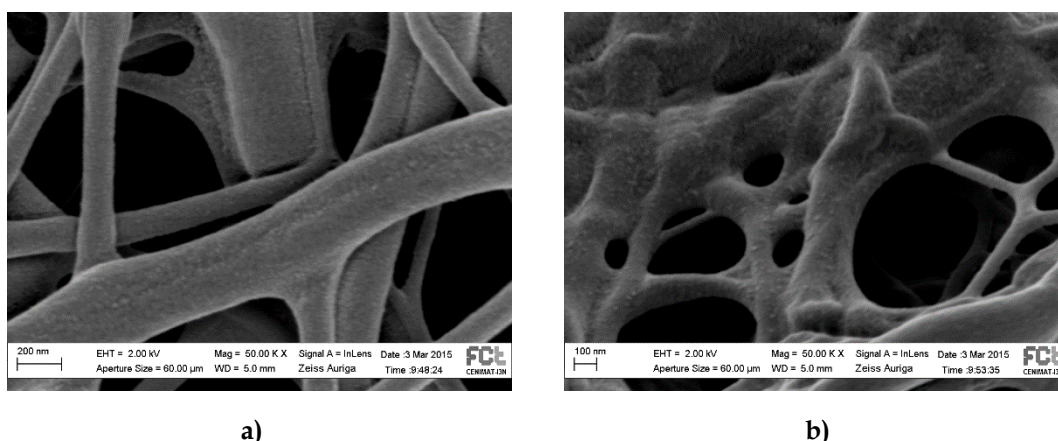


Figura 4.13 Imagens de SEM das membranas de 12% (m/m) de AC com óxido de grafeno após redução com vapores de hidrazina: a) 1% (m/m) de OG após 12 horas de redução e b) 2% (m/m) de OG depois de 48 horas de redução.

4.4.2. Determinação da tensão de circuito aberto

Este estudo teve a duração de 1 hora para verificar a estabilidade da membrana separadora de AC e dos diferentes conjuntos de elétrodos (Au/PPi, Au/PAni, PPi/PAni e OGR/PAni). A figura 4.14 representa o valor de V_{oc} fornecido pela biobateria, que estabilizou após 20 minutos.

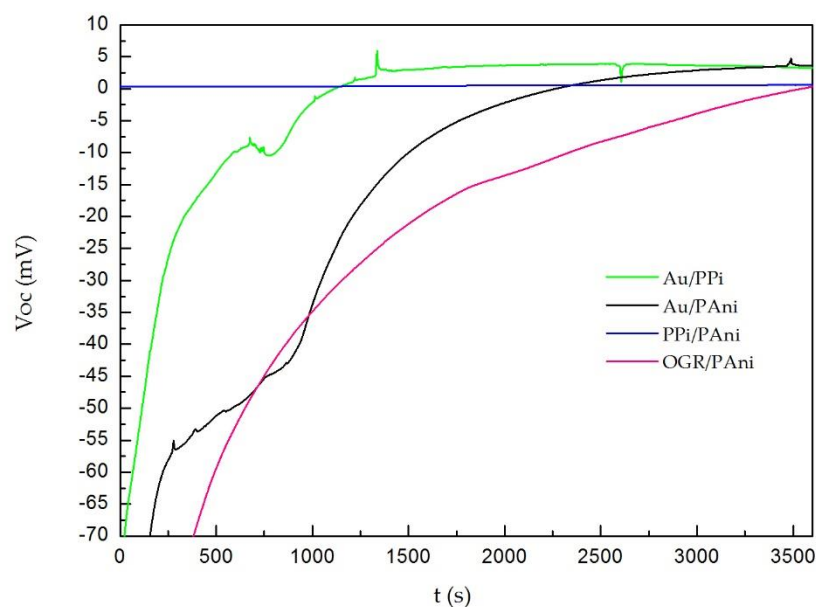


Figura 4.14 Gráfico da tensão de circuito aberto (V_{oc}) para as diferentes combinações de elétrodos com SBF como eletrólito.

Como eletrólito foram adicionados 0,1 ml de SBF para cada medição e foram utilizadas 3 membranas de AC como separador totalizando uma espessura média de $146,0 \pm 28,2 \mu\text{m}$. Os valores de V_{oc} , após 1 hora, para cada uma das combinações de elétrodos são os seguintes: 3,59 mV (Au/PAni); 3,24 mV (Au/PPi); 0,60 mV (PPi/PAni) e 0,31 mV (OGR/PAni).

4.4.3. Voltametria Cíclica

4.4.3.1. Influência dos elétrodos

Polianilina

A voltametria cíclica permite-nos estudar o comportamento eletroquímico da bateria e quais as reações de redução e oxidação que nela decorrem entre o eletrólito e elétrodos. Foram testados vários elétrodos no dispositivo e inicialmente foi utilizada a membrana de AC revestida com PAni no elétrodo de trabalho (E-T) com as configurações de elétrodos apresentadas na figura 4.15. Foram utilizadas 3 membranas de AC como separador entre os elétrodos com um total de espessura média de $126,0 \pm 25,4 \mu\text{m}$.

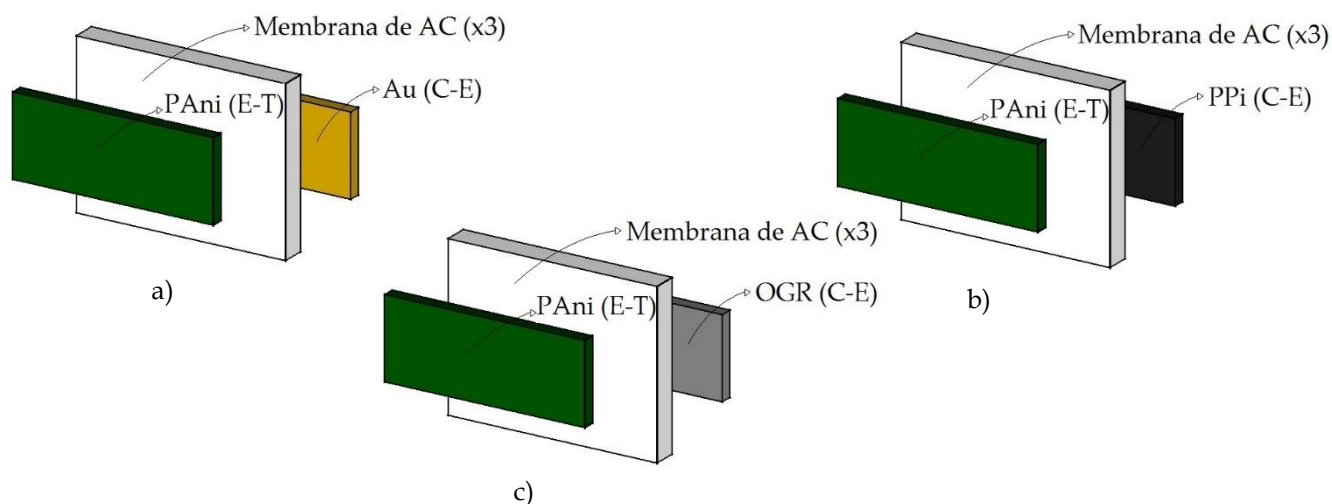


Figura 4.15 Combinações de eletrodos testados com PANi no eletrodo de trabalho e diferentes contra-eletrodos: a) Au; b) PPI e c) OGR.

Os voltamogramas da figura 4.16 apresentam as várias densidades de corrente ($\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$) atingidas, determinadas tendo em conta as áreas dos eletrodos, que variaram entre $0,5 \text{ cm}^2$ e 1 cm^2 . O dispositivo foi imerso em $0,1 \text{ ml}$ de solução de SBF e as curvas apresentadas correspondem ao 5º ciclo. Foi escolhida uma velocidade de varrimento de $80 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ por ser a que melhor representa a totalidade das reações ocorridas (consultar anexo F).

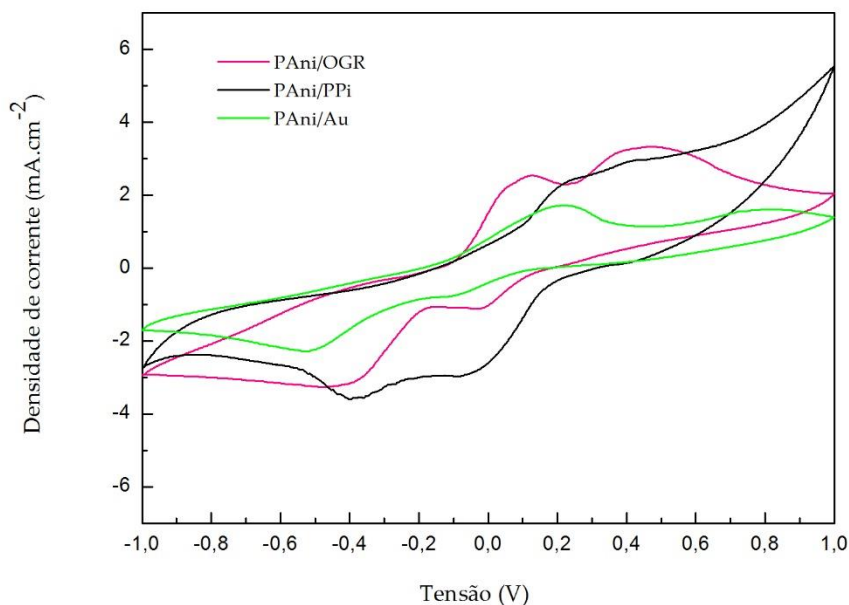
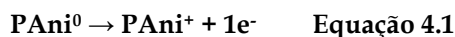


Figura 4.16 Voltamogramas (5º ciclo) obtidos para várias combinações de eletrodos (PANi no eletrodo de trabalho), com uma velocidade de varrimento de $80 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

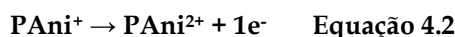
É possível observar na figura 4.16, a existência de 2 picos anódicos e 2 picos catódicos para as curvas apresentadas. Estes picos indicam a ocorrência de reações de oxidação e redução pela

PAni, que se encontra no eletrodo de trabalho para todas as curvas apresentadas. Por exemplo, analisando a curva PAni/OGR, observa-se o primeiro pico anódico aos 0,12 V e o segundo pico aos 0,46 V, sugerindo-se a ocorrência das seguintes reações de oxidação:

1ª oxidação



2ª oxidação

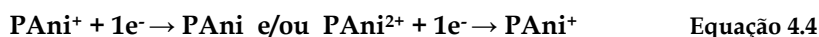


Para a mesma curva, os picos catódicos são observáveis, em primeiro lugar aos -0,03 V, que poderá corresponder a uma reação de redução do oxigênio proveniente da água existente na solução de SBF (eletrólito) [43] e o segundo pico regista-se por volta dos -0,46V. Sugere-se a ocorrência das seguintes reações de redução:

1ª redução



2ª redução



Dada a simetria dos primeiros picos anódico e catódico (0,46 V e - 0,46 V, respetivamente) e tendo em conta a separação entre os segundos picos, pode-se afirmar que estamos perante um processo *quasi-reversível*, cujas reações são provocadas pelas interações entre os iões presentes no eletrólito, os eletrodos e a membrana separadora de AC. Este facto pode ser confirmado com a razão entre a densidade de corrente catódica e a densidade de corrente anódica (j_{pc}/j_{pa}) que deverá igualar o valor unitário para se considerar uma reação reversível. Para os picos de oxidação/redução da PAni (0,46 V e - 0,46 V), $|j_{pc}/j_{pa}|$ tem o valor de 0,98. Foram atingidos os seguintes valores de densidade de corrente (anódica) para as várias combinações de eletrodos em causa: 3,32 mA.cm⁻² para PAni/OGR; 3,01 mA.cm⁻² para PAni/PPi e 1,72 mA.cm⁻² para PAni/Au.

Polipirrol

Também foi testada a membrana de AC revestida com PPi no eletrodo de trabalho (E-T) com as configurações de eletrodos apresentadas na figura 4.17. Foram utilizadas 3 membranas de AC como separador entre os eletrodos com um total de espessura média de 146,0 ± 15,6 µm. Na figura 4.18 estão representados os voltamogramas para os vários eletrodos, com uma área que variou entre 0,5 cm² e 1 cm². O dispositivo foi imerso em 0,1 ml de solução de SBF e as curvas apresentadas correspondem ao 5º ciclo, com uma velocidade de varrimento de 80 mV.s⁻¹.

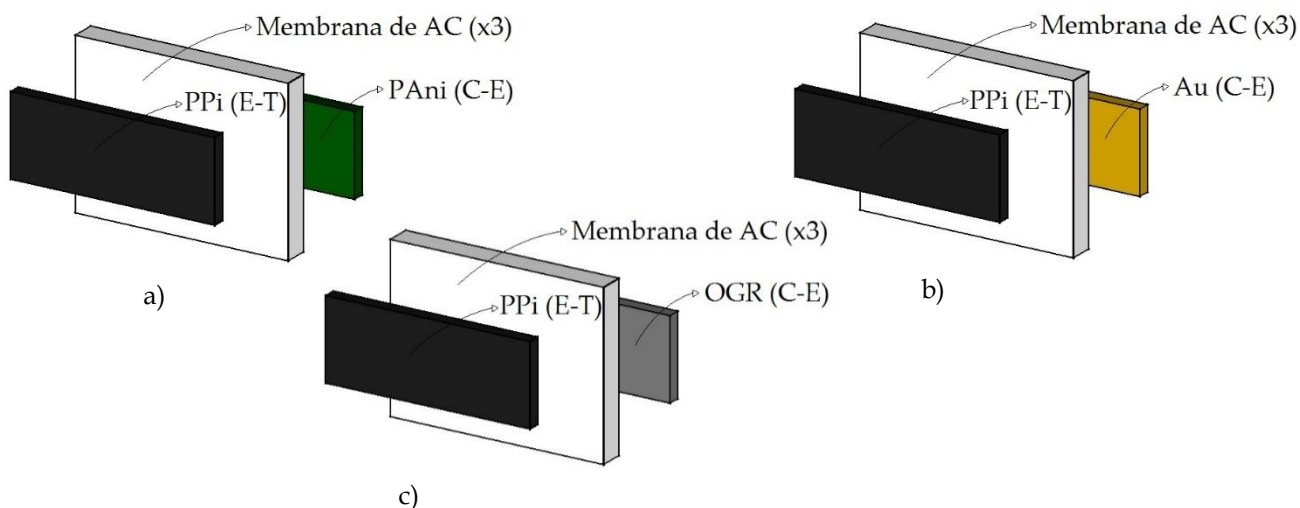


Figura 4.17 Combinações de eletrodos testados com PPI no eletrodo de trabalho e diferentes contra-eletrodos: a) PAni; b) Au e c) OGR.

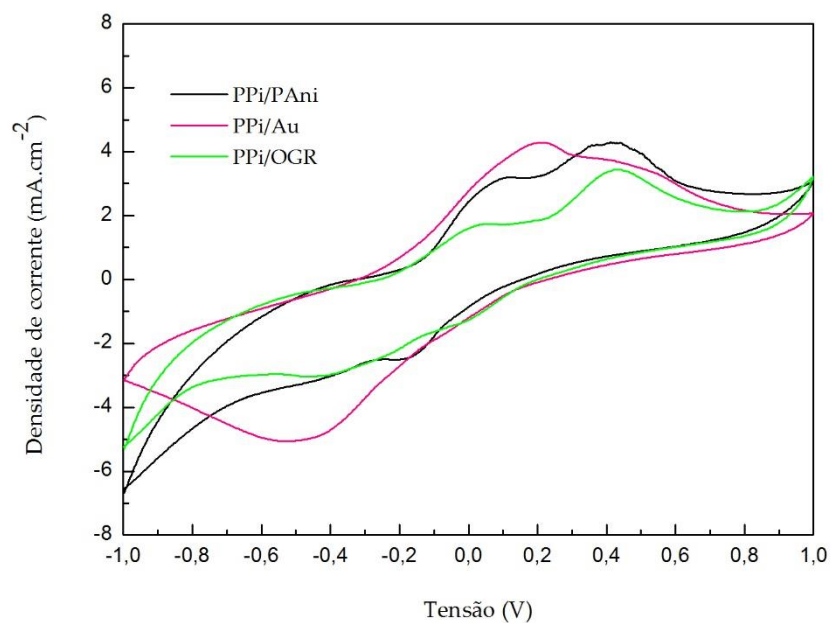


Figura 4.18 Voltamogramas (5º ciclo) obtidos para várias combinações de eletrodos (PPI no eletrodo de trabalho), com uma velocidade de varrimento de 80 mV.s⁻¹.

Na figura 4.18 é possível observar a existência de 2 picos anódicos e de 1 ou 2 picos catódicos na utilização da PPI como eletrodo de trabalho. Analisando novamente a curva com OGR, o primeiro pico anódico é registado aos 0,05 V e o segundo pico aos 0,40 V, indicando a possível ocorrência das seguintes reações de oxidação: [43]

1ª oxidação



Equação 4.5

2ª oxidação

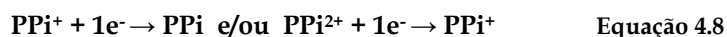


Por outro lado, é registado um primeiro pico catódico por volta dos -0,02 V correspondente à redução do oxigénio, embora este pico não seja detetado para a curva com os elétrodo PPi/Au. O segundo pico catódico é registado aos -0,45 V, onde poderá ocorrer a redução da PPi.

1ª redução



2ª redução



Neste caso, também se pode afirmar que estamos perante um processo quasi-reversível, com um valor de $|j_{pc}/j_{pa}|$ para as reações de oxidação/redução da PPi igual a 1,44 e com o valor de 0,88 para os segundos picos. Foram atingidos os seguintes valores de densidade de corrente (anódica) para as várias combinações de elétrodo em causa: 3,44 mA.cm⁻² para PPi/OGR; 4,30 mA.cm⁻² para PPi/PAni e 4,29 mA.cm⁻² para PPi/Au.

Após análise de todas as combinações de elétrodo, constata-se que o valor mais elevado de densidade de corrente registado foi para o conjunto de elétrodo PPi/PAni, com PPi no E-T.

4.4.3.2. Estabilidade e reprodutibilidade

Este ensaio teve como objetivo observar a estabilidade do dispositivo. No voltamograma da figura 4.19 apresentam-se alguns ciclos para o conjunto de elétrodo PPi (E-T)/PAni (C-E).

Foram utilizados elétrodo com uma área de 0,5 cm², uma membrana de separadora de AC com uma espessura média de 146,0 ± 15,6 μm e as medições foram efetuadas após a adição de 0,1 ml de SBF e com uma velocidade de varrimento de 80 mV.s⁻¹.

Pela observação do gráfico conclui-se que existe uma reprodutibilidade dos valores ao longo dos vários ciclos apresentados. Verifica-se uma semelhança no 7º e no 10º ciclo, o que evidencia a reprodutibilidade do dispositivo indicando que este apresenta uma densidade de corrente dos picos anódico e catódico constante e é electroquimicamente estável.

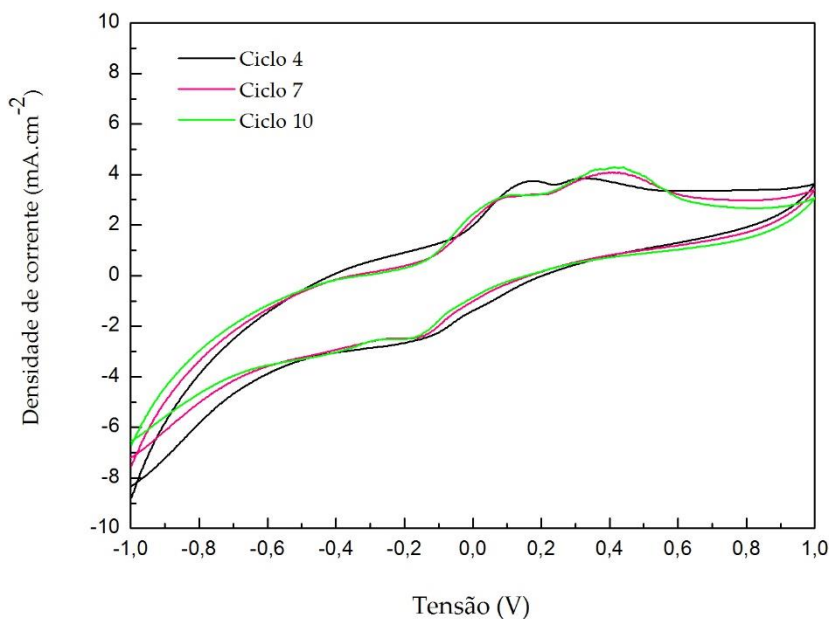


Figura 4.19 Voltamogramas (4º, 7º e 10º ciclo) para os elétrodo PPi (E-T)/PAni (C-E).

4.4.3.3. Influência dos eletrólitos

Dadas as potencialidades da utilização da glucose como eletrólito por ser uma fonte de energia natural e devido à sua abundância, testaram-se várias soluções de SBF com diferentes concentrações de glucose para que fosse avaliada a sua viabilidade como eletrólito no dispositivo.

No gráfico da figura 4.20 estão presentes os voltamogramas obtidos para a membrana seca e para diferentes concentrações de glucose (50 mg/dL, 100 mg/dL, 150 mg/dL e 200 mg/dL) para um dispositivo com os elétrodo polipirrol (E-T) e polianilina (C-E), de área 0,5 cm², com uma membrana separadora de AC com uma espessura de 189,0 ± 15,6 µm. Foram adicionados 0,1 ml de eletrólito (SBF e glucose) em cada medida, com uma velocidade de varrimento de 80 mV.s⁻¹ (consultar anexo F) e os resultados são referentes ao 10º ciclo de cada ensaio.

No gráfico apresentado verifica-se que, para a membrana seca (sem eletrólito), a densidade de corrente registada é muito baixa. Com a imersão da membrana nas soluções de glucose, as moléculas e os iões presentes na solução entram em contacto com a matriz polimérica e com os elétrodo, proporcionando a ocorrência de reações e a criação de um fluxo de eletrões entre os mesmos.

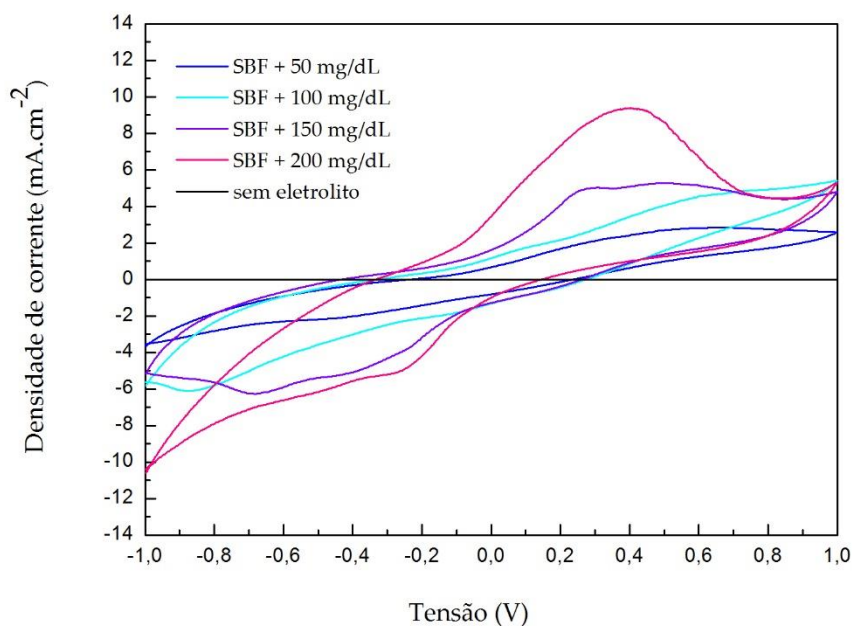


Figura 4.20 Voltamogramas (10º ciclo) para as várias concentrações de glucose (50 mg/dL, 100 mg/dL, 150 mg/dL e 200 mg/dL) com os elétrodos PPI (E-T) / PAni (C-E).

É detetado um pico anódico para todas as curvas por volta dos 0,40 V e o pico catódico ocorre aos - 0,40 V. Dada a simetria dos picos, sugere-se a existência de um processo reversível. As densidades de corrente registadas para os dois picos encontram-se na tabela 4.8.

Tabela 4.8 Densidades de corrente para as soluções de SBF com diferentes concentrações de glucose

SBF e concentrações de glucose (mg/dL)	J_{pa} (mA.cm ⁻²)	J_{pc} (mA.cm ⁻²)
0	4,27	-3,07
50	2,43	-2,05
100	3,46	-3,08
150	5,11	-5,15
200	9,39	-5,64

Observa-se um aumento da densidade de corrente registada à medida que a concentração de glucose aumenta. Isto poderá dever-se à competição entre os sais da solução de SBF e as moléculas de glucose, de maiores dimensões, o que poderá levar a uma maior mobilidade iónica e aumentar a transferência de carga nos canais ao longo da matriz de AC entre os elétrodos. [43]

Capítulo 5. Conclusões e perspectivas futuras

O presente projeto teve como resultado uma biobateria capaz de produzir energia elétrica a partir de glucose. As várias fases do trabalho consistiram na produção e caracterização da matriz polimérica de acetato de celulose e dos elétrodos suportados pela mesma.

Para a obtenção de uma boa matriz polimérica e para que esta permitisse um correto fluxo eletrónico entre os elétrodos, foi realizado um estudo para otimização da sua produção por eletrofiação. A partir deste estudo selecionou-se uma membrana produzida a partir de uma solução com 12 % (m/m) de AC nos solventes acetona e DMAc (na proporção 2:1, respetivamente), com uma tensão de 20 kV, uma distância de 15 cm e um caudal de 0,2 ml.h⁻¹, que correspondem às condições ótimas de produção por eletrofiação. As fibras da membrana resultante apresentam uma distribuição de diâmetros uniforme, com uma média de 325 nm e são isentas de defeitos. Para a caracterização da membrana obtida foram realizados testes de degradação durante 3 meses e testes de citotoxicidade. Nos testes de degradação concluiu-se que não existiu uma degradação significativa da membrana, com ausência de degradação visível das fibras após o tempo total do estudo, apresentando apenas uma perda de massa de 7,3% relativamente à massa inicial, sugerindo a existência de uma leve erosão volúmica. Nos testes de citotoxicidade, verificou-se a biocompatibilidade do acetato de celulose após 24 horas e 48 horas de contacto com a cultura celular.

Foram utilizados os polímeros polipirrol e polianilina para o revestimento das matrizes poliméricas de AC de forma a serem utilizados como elétrodos da biobateria. Como alternativa aos elétrodos poliméricos, testou-se a viabilidade do óxido de grafeno reduzido para esta função, no entanto, este foi um estudo pioneiro que necessita ainda de otimização considerando os resultados promissores do mesmo. Para a caracterização dos elétrodos poliméricos, realizaram-se igualmente testes de degradação e citotoxicidade. Conclui-se que estes elétrodos são citotóxicos para as células, permitindo apenas uma sobrevivência celular de 40% a 50% após as primeiras 24 horas de contacto com a cultura celular. Como estes resultados não eram esperados, conclui-se que os métodos de lavagem das membranas após a polimerização devem ser melhorados de forma a eliminar certos subprodutos resultantes do processo nomeadamente cloro

e enxofre, detetados nas membranas após a realização de um mapeamento por EDS (consultar anexo E), que podem ser prejudiciais para as células. Sugere-se, para as membranas de PANi, uma purificação das membranas com uma reprotonação a partir de uma imersão em ácidos fortes, seguida por uma desprotonação numa solução básica [41], como complemento às lavagens já realizadas com água destilada e etanol.

Relativamente aos ensaios de degradação, foi feita uma medição da condutividade dos elétrodos de PPi e PANi antes e após o estudo, onde se verificou uma perda da condutividade dos mesmos. Dados estes resultados, será necessário executar mais estudos para determinar qual a causa da perda de condutividade e como melhorar o processo, contudo, como alternativa estes poderão ser utilizados em dispositivos temporários não implantáveis. Também foi determinada a condutividade para os elétrodos com óxido de grafeno reduzido, onde foi atingido um valor de $1,7 \times 10^{-6} \text{ S.cm}^{-1}$.

Finalmente, verificou-se que a glucose pode ser utilizada como eletrólito para a biobateria onde se verificou um aumento da densidade de corrente com o aumento da concentração de glucose na solução de SBF. Para os elétrodos PPi/PANi, atingiu-se uma densidade de corrente anódica de $9,39 \text{ mA.cm}^{-2}$ para o valor mais elevado de concentração de glucose. Este comportamento também foi verificado para outras combinações de elétrodos, como por exemplo, para os elétrodos Au/PANi com as seguintes densidades de corrente para o pico anódico, da menor para a maior concentração de glucose: $1,44 \text{ mA.cm}^{-2}$; $3,12 \text{ mA.cm}^{-2}$; $3,34 \text{ mA.cm}^{-2}$ e $3,82 \text{ mA.cm}^{-2}$.

Os valores de densidade de corrente atingidos confirmam a aplicabilidade da bateria produzida na alimentação de pequenos dispositivos médicos permitindo também a sua utilização na determinação de situações de hipoglicémia e de hiperglicemia embora, no futuro, possa ser feito um estudo mais aprofundado com uma gama mais alargada de concentrações de glucose, nomeadamente entre 50 mg/dL e 100 mg/dL , que correspondem aos valores mais comuns presentes no corpo humano e estudar a sua relação com os diferentes valores de densidade de corrente. Os métodos de lavagem dos revestimentos para a produção dos elétrodos também poderão ser otimizados para permitir a utilização do dispositivo em equipamentos médicos implantáveis, bem como determinar quais as causas concretas da perda de condutividade dos elétrodos em meio fisiológico para prolongar a sua vida útil e serem utilizados em dispositivos mais duradouros.

Referências bibliográficas

- [1] S. Li, Z. P. Guo, C. Y. Wang, G. G. Wallace, and H. K. Liu, "Flexible cellulose based polypyrrole–multiwalled carbon nanotube films for bio-compatible zinc batteries activated by simulated body fluids," *J. Mater. Chem. A*, vol. 1, pp. 14300–14305, 2013.
- [2] A. C. Baptista, J. I. Martins, E. Fortunato, R. Martins, J. P. Borges, and I. Ferreira, "Thin and flexible bio-batteries made of electrospun cellulose-based membranes," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 5, pp. 2742–2745, 2011.
- [3] A. C. Baptista, J. P. Borges, and I. Ferreira, "Produção de biobaterias a partir de membranas obtidas pela técnica de eletrofiação," *Ciência e Tecnol. dos Mater.*, vol. 22, pp. 2–13, 2010.
- [4] U. Z. Siddiqui and A. K. Pathrikar, "The future of energy bio battery," *Int. J. Res. Eng. Technol.*, pp. 99–111, 2013.
- [5] J. Larminie and A. Dicks, *Fuel cell systems explained*, 2nd ed. J. Wiley, 2003.
- [6] H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, "A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions," *Energy Environ. Sci.*, vol. 2, no. i, pp. 133–138, 2009.
- [7] W. Zheng, J. Y. Ma, F. Guo, J. Li, H. M. Zhou, X. X. Xu, L. Li, and Y. F. Zheng, "A novel biofuel cell based on electrospun collagen-carbon nanotube nanofibres," *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, pp. 229–235, 2014.
- [8] V. Oncescu and D. Erickson, "A microfabricated low cost enzyme-free glucose fuel cell for powering low-power implantable devices," *J. Power Sources*, vol. 196, no. 22, pp. 9169–9175, 2011.
- [9] V. L. Pushparaj, M. M. Shaijumon, A. Kumar, S. Murugesan, L. Ci, R. Vajtai, R. J. Linhardt, O. Nalamasu, and P. M. Ajayan, "Flexible energy storage devices based on nanocomposite paper," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, pp. 13574–13577, 2007.
- [10] Y. Chen, K. P. Prasad, X. Wang, H. Pang, R. Yan, A. Than, M. B. Chan-Park, and P. Chen, "Enzymeless multi-sugar fuel cells with high power output based on 3D graphene-Co₃O₄ hybrid electrodes," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, pp. 9170–6, 2013.

- [11] J. Y. Wang, P. C. Nien, C. H. Chen, L. C. Chen, and K. C. Ho, "A glucose bio-battery prototype based on a GDH/poly(methylene blue) bioanode and a graphite cathode with an iodide/tri-iodide redox couple," *Bioresour. Technol.*, vol. 116, pp. 502–506, 2012.
- [12] Z. Zhu, T. Kin Tam, F. Sun, C. You, and Y.-H. Percival Zhang, "A high-energy-density sugar biobattery based on a synthetic enzymatic pathway," *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3026, 2014.
- [13] A. C. Baptista, I. Ferreira, and J. P. Borges, *Cellulose-based Composite Systems for Biomedical Applications*. Smithers Rapra, 2013.
- [14] D. a. Cerqueira, G. Rodrigues Filho, R. D. a. Carvalho, and A. J. M. Valente, "Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por ^1H -RMN," *Polímeros*, vol. 20, pp. 85–91, 2010.
- [15] Global Acetate Manufacturers Association, "Analysing Acetate for Ecological Behaviour and Sustainability." [Online]. Available: <http://acetateweb.com/technical-info/>. [Accessed: 20-Aug-2014].
- [16] D. D. Ateh, H. a Navsaria, and P. Vadgama, "Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues," *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, no. June, pp. 741–752, 2006.
- [17] X. Wang, X. Gu, C. Yuan, S. Chen, P. Zhang, T. Zhang, J. Yao, F. Chen, and G. Chen, "Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 68, pp. 411–422, 2004.
- [18] T. P. Amaral, G. M. O. Barra, F. L. Barcia, and B. G. Soares, "Estudo das Propriedades de Compósitos de Polianilina e Resina Epoxídica," *Polímeros*, vol. 11, pp. 149–157, 2001.
- [19] P. C. Rodrigues, "Síntese, caracterização e correlações estrutura/propriedades de redes mistas de polianilina/poliuretano com arquitetura molecular pré-desenhada," 2004.
- [20] S. Xie, B. Zhang, C. Wang, Z. Wang, L. Li, and J. Li, "Building up graphene-based conductive polymer composite thin films using reduced graphene oxide prepared by γ -ray irradiation," *ScientificWorldJournal*, vol. 2013, p. 954324, 2013.
- [21] J. Ou, J. Wang, S. Liu, B. Mu, J. Ren, H. Wang, and S. Yang, "Tribology study of reduced graphene oxide sheets on silicon substrate synthesized via covalent assembly," *Langmuir*, vol. 26, no. 10, pp. 15830–15836, 2010.
- [22] K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. Zhang, Y. Wo, S. Guo, and D. Cui, "Biocompatibility of Graphene Oxide," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–8, 2011.
- [23] W. of Molecules, "Glucose." [Online]. Available: <http://www.worldofmolecules.com/foods/glucose.htm>. [Accessed: 27-Aug-2014].
- [24] Hyperphysics., "Glucose." [Online]. Available: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/organic/sugar.html>. [Accessed: 27-Aug-2014].

- [25] D. Li and Y. Xia, "Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?," *Adv. Mater.*, vol. 16, no. 14, pp. 1151–1170, 2004.
- [26] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 63, pp. 2223–2253, 2003.
- [27] H. Matsumoto and A. Tanioka, "Functionality in electrospun nanofibrous membranes based on fiber's size, surface area, and molecular orientation," *Membranes (Basel)*, vol. 1, pp. 249–264, 2011.
- [28] A. C. Baptista, "Development of Bio-batteries based on electrospun membranes," PhD. in Materials Science and Engineering, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2014.
- [29] P. Partal and J. M. Franco, "Non-Newtonian Fluids," *Rheol. Encycl. life Support Syst. (EOLSS)*, UNESCO. Eolss, Oxford, vol. 1, pp. 96–119, 2010.
- [30] S. Pilling, "Determinação da Viscosidade de Líquidos," 2012.
- [31] H. Johnston and S. Sourirajan, "Mark-Houwink constants for some cellulose acetate–organic solvent systems," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 3375–3380, 1972.
- [32] P. Gupta, C. Elkins, T. E. Long, and G. L. Wilkes, "Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): Exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent," *Polymer (Guildf)*, vol. 46, pp. 4799–4810, 2005.
- [33] K. D. Vernon-Parry, "Scanning electron microscopy: an introduction," *III-Vs Rev.*, vol. 13, no. 4, pp. 40–44, 2000.
- [34] W. C. Nixon, "The General Principles of Scanning Electron Microscopy," *Jstor*, vol. 261, no. 837, pp. 45–50, 1971.
- [35] G. Höflinger, "Brief Introduction to Coating Technology for Electron Microscopy," *Leica Microsystems*. [Online]. Available: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-coating-technology-for-electron-microscopy/>. [Accessed: 05-Feb-2015].
- [36] M. Phiriyawirut and T. Phaechamud, "Gallic Acid-loaded Cellulose Acetate Electrospun Nanofibers : Thermal Properties , Mechanical Properties , and Drug Release Behavior," vol. 2012, no. February, pp. 21–29, 2012.
- [37] B. Ulery, L. Nair, and C. Laurencin, "Biomedical applications of biodegradable polymers," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 49, no. 12, pp. 832–864, 2011.
- [38] B. Romba, "Biodispositivos electrónicos multifuncionais," Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2013.
- [39] D. Andrienko, "Cyclic Voltammetry," *Cycl. Voltammetry*, pp. 1–12, 2008.

- [40] W. F. Pacheco, F. S. Semaan, V. G. K. De Almeida, A. G. S. L. Ritta, and R. Q. Aucélio, "Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos," *Rev. Virtual Quím.*, vol. 5, no. 4, pp. 516–537, 2013.
- [41] P. Humpolicek, V. Kasparkova, P. Saha, and J. Stejskal, "Biocompatibility of polyaniline," *Synth. Met.*, vol. 162, pp. 722–727, 2012.
- [42] M. Trchová, Z. Morávková, I. Šeděnková, and J. Stejskal, "Spectroscopy of thin polyaniline films deposited during chemical oxidation of aniline," *Chem. Pap.*, vol. 66, no. 5, pp. 415–445, 2012.
- [43] S. Li, K. Shu, C. Zhao, C. Wang, Z. Guo, G. Wallace, and H. K. Liu, "One-Step Synthesis of Graphene / Polypyrrole Nano fiber Composites as Cathode Material for a Biocompatible Zinc / Polymer Battery," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 19, pp. 16679–16686, 2014.
- [44] "Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal." [Online]. Available: <http://www.apdp.pt/>. [Accessed: 05-Feb-2015].
- [45] S.-A. European Collection of Cell Cultures, *Fundamental Techniques in Cell Culture - Laboratory Handbook*, 2nd ed., vol. 1. 2010.

Anexos

Anexo A – Preparação das soluções de eletrólitos

Como eletrólitos, foram testadas soluções de SBF (do inglês *Simulated Body Fluid*), dada a sua semelhança em concentração de sais com o plasma sanguíneo e também foram testadas soluções de glucose com várias concentrações. A tabela seguinte permite-nos comparar os valores de concentrações iónicas entre o plasma sanguíneo e a solução de SBF utilizada.

Tabela A 1 Comparação entre as concentrações iónicas do plasma sanguíneo e da solução utilizada

Concentração iónica (mM)	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142	6,5	1,5	2,5	148	4,2	1,0	0
Plasma sanguíneo	142	5,5	1	2,6	107	27	1,54	1

Preparação da solução de SBF

A solução preparada teve como base receitas utilizadas em trabalhos anteriores no Departamento de Ciência dos Materiais, da FCT/UNL. Os reagentes utilizados, bem como as quantidades respetivas, encontram-se na tabela A 2.

Tabela A 2 Reagentes utilizados para a preparação da solução de SBF

Reagente	Iões	Quantidade (g/l)	Marca
NaCl	Cl ⁻ ; Na ⁺	6,547	<i>J.T. Bucker</i>
NaHCO ₃	Na ⁺ ; HCO ₃ ⁻	2,268	<i>Merck</i>
KCl	K ⁺ ; Cl ⁻	0,373	<i>Panreac</i>
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Na ⁺ ; HPO ₄ ²⁻	0,178	<i>Fluka</i>
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Mg ²⁺ ; Cl ⁻	0,305	<i>Sigma-Aldrich</i>
1M HCl	H ⁺ ; Cl ⁻	15 ml	-----
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Ca ²⁺ ; Cl ⁻	0,368	<i>Sigma-Aldrich</i>
Na ₂ SO ₄	Na ⁺ ; SO ₄ ²⁻	0,071	<i>Panreac</i>
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	-----	6,057	<i>Sigma-Aldrich</i>
1M HCl	-----	Titular até ser atingido um pH 7,4	-----

Os reagentes são adicionados a 700 ml de água destilada pela ordem que se apresenta na tabela A 2 e, após a adição do último reagente, aqueceu-se a solução desde a temperatura ambiente até atingir 37°C. Por fim, acrescentou-se água destilada até perfazer 1 litro de solução e esta pôde ser utilizada durante um mês, armazenada num frigorífico a 5°C.

Preparação das soluções de glucose

As soluções de glucose foram preparadas tendo em conta os níveis de glucose normais existentes no sangue. Os valores normais para pessoas saudáveis, após 8 horas de jejum, encontram-se abaixo de 100 mg/dL, por outro lado, para diabéticos, os valores de glucose na circulação sanguínea ultrapassam os 126 mg/dL. [44]

Foram preparadas soluções de glucose (*Sigma Aldrich*) com as concentrações de 50 mg/dL, 100 mg/dL, 150 mg/dL e 200 mg/dL para a realização dos ensaios eletroquímicos.

[44] “Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal.” [Online]. Available: <http://www.apdp.pt/>. [Accessed: 05-Feb-2015].

Anexo B – Procedimento para preparação da solução de PBS (estudo de degradação)

A solução de PBS (do inglês, *Phosphate buffered saline*) preparada corresponde a uma concentração de 10 vezes e a um volume final de 500 ml. Os reagentes são adicionados um a um e são dissolvidos em 400 ml de água destilada (ultra-pura). Se, após a dissolução dos reagentes, a solução não apresentar um pH de 7,4, será necessária a adição de ácido clorídrico (HCl) até que esse valor seja atingido. Se o volume final não corresponder aos 500 ml, deve-se acrescentar água destilada até perfazer esse volume.

Tabela B 1 Reagentes utilizados na preparação da solução de PBS

Reagentes	Quantidade (g/l)	Ião	Marca
NaCl	80	Na ⁺ ; Cl ⁻	<i>J. T. Baker</i>
KCl	2	K ⁺ ; Cl ⁻	<i>Sigma-Aldrich</i>
Na ₂ HPO ₄	14,4	Na ⁺ ; HPO ₄ ²⁻	<i>Sigma-Aldrich</i>
KH ₂ PO ₄	2,4	K ⁺ ; H ₂ PO ₄ ⁻	<i>Sigma-Aldrich</i>

Para a diluição da solução, retirou-se 100 ml da solução de PBS concentrada e adicionaram-se 900 ml de água destilada (ultra-pura), perfazendo um volume total de 1 litro.

Anexo C - Procedimento para preparação de culturas celulares e determinação da citotoxicidade

É de extrema importância que todos os materiais utilizados no decorrer do processo estejam desinfetados para evitar a contaminação das células. Sendo assim, devem ser executados os procedimentos descritos seguidamente:

- ✓ Antes do início do trabalho a câmara de segurança microbiológica deve ser desinfetada com isopropanol a 70%.
- ✓ As luvas utilizadas devem ser igualmente desinfetadas, tal como todo o material a ser inserido na câmara de segurança microbiológica antes de ser utilizado.
- ✓ As luvas não devem ser contaminadas ao entrarem em contacto com algum material que se encontre fora da câmara de segurança ou com o cabelo ou pele. Se contaminadas, pulverizar de novo com isopropanol.
- ✓ As luvas devem ser descartadas após o contacto com culturas contaminadas e após todos os procedimentos de cultura celular.

As linhagens de células aderentes necessitam de uma superfície de contacto (*in vitro*) para proliferarem até que a superfície disponível esteja completamente ocupada ou até que o meio esteja desprovido de nutrientes. Antes deste ponto, pode-se fazer uma subcultura das células para que a primeira cultura não seja destruída, executando-se uma suspensão da cultura após a remoção das células da superfície onde se encontram com o auxílio de enzimas. [45]

1. Preparação da subcultura celular

A cultura celular foi observada com um microscópio para garantir a ausência de contaminações fúngicas ou microbianas e observar o seu grau de confluência, ou seja, se a cultura se encontrava corretamente no espaço destinado para ela. O meio de cultura foi removido e lavou-se a cultura celular com PBS sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (preferencialmente metade do volume do meio de cultura inicial).

As células encontravam-se aderidas a uma parede do frasco onde se encontravam inseridas e, desta forma, foram adicionados 500 μl de tripsina para libertar as células da parede do frasco. A cultura foi colocada na estufa durante 5 minutos, a 37°C e 5% de CO_2 . Após este período, foram adicionados 5 ml de meio de cultura para interromper a atividade enzimática, foram feitas

resuspensões e verificou-se de novo a cultura ao microscópio para confirmar a suspensão da mesma.

Retiraram-se 100 µl da suspensão para efetuar uma contagem de células de modo a garantir uma densidade celular adequada para o estudo em causa. Adicionaram-se igualmente 100 µl de *Trypan Blue* à suspensão anterior para distinguir as células viáveis das não viáveis. Para a realização de uma contagem de células, adicionou-se uma amostra da suspensão num hemacitómetro para uma estimativa da densidade celular. Estimaram-se 542 mil células por mililitro.

Foi selecionado o valor de 4 mil células para a realização da cultura celular nos poços, tendo este valor de ser multiplicado pelo número total de poços (50 poços). Para a obtenção da densidade celular desejada, foram adicionados 405 µl de meio com as células a 5095 µl de meio de cultura fresco. Esta solução foi adicionada aos 50 poços necessários, 20 dos quais serviram para o controlo positivo e negativo de células. As células foram colocadas na incubadora a 37°C durante 24 horas.

2. Adição do meio condicionado à cultura celular

Para um estudo da citotoxicidade após 24 horas e 48 horas do contacto das células com o meio condicionado (que esteve em contacto com as membranas), prepararam-se 2 conjuntos de 25 poços (total de 50 poços), cada um contendo 5 réplicas para cada amostra: meio que esteve em contacto com a membrana de AC, meio em contacto com a membrana de AC revestida com PPi, meio em contacto com a membrana de AC revestida com PAni, controlo positivo e controlo negativo.

Após a verificação de uma correta adesão das células nas paredes dos poços, retirou-se o meio de todos os poços (este procedimento foi realizado de 5 em 5 poços para evitar a secagem das células) e foram adicionados 100 µl dos meios condicionados nos respetivos poços. No controlo negativo de células foi adicionado apenas meio de cultura celular e no controlo negativo de células foi adicionado meio de cultura juntamente com 20% de DMSO (20 µl em 100 µl de meio) com o objetivo de provocar morte celular.

3. Determinação da citotoxicidade das membranas

A resazurina tem uma coloração azul e é frequentemente utilizada como indicador da viabilidade celular. Esta é reduzida a resofurina, com uma coloração cor-de-rosa fluorescente,

apenas pelas células que se encontram metabolicamente ativas. O nível de alteração de coloração é determinado pela medição da variação da absorvância.

Após 24 e 48 horas de contacto das células com o meio condicionado, foram adicionados 400 µl de resazurina (PrestoBlue®) a 4 ml de meio de cultura (10% de resazurina) para que fossem adicionados 120 µl em cada poço (depois da aspiração dos mesmos). Estes foram conservados na incubadora a 37 °C e a 5% de CO₂ durante 3 horas para a metabolização da resazurina e, após este período, as absorvâncias foram medidas por espectrofotometria (com um leitor de microplacas Biotek ELX 800 UV), a 570 nm e 600 nm, comprimentos de onda que correspondem à absorção máxima de resofurina e de resazurina, respetivamente. É de extrema importância verificar se houve formação de bolhas de ar nos poços e, caso haja, estas devem rebentadas com o auxílio de uma agulha.

Contagem de células

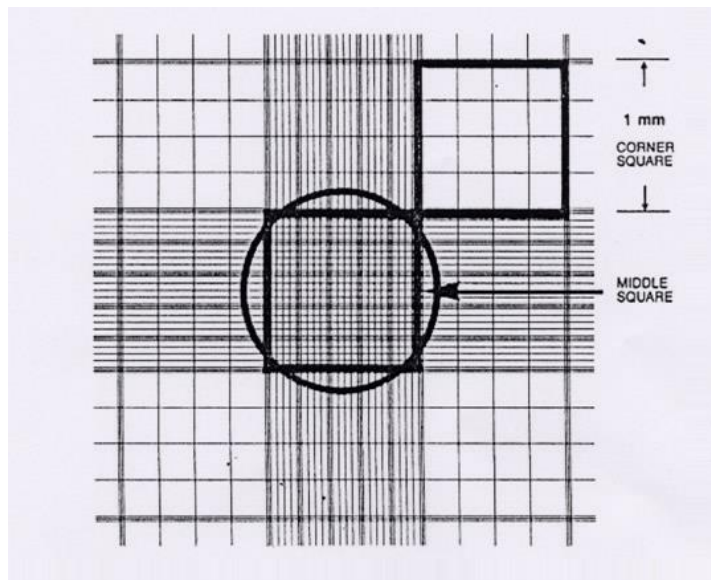
1. Após a remoção de 100 µl da suspensão deve-se adicionar a mesma quantidade de Trypan Blue® (para a distinção das células vivas e mortas com um fator de diluição = 2).
2. Limpar o hemacitómetro com álcool (isopropanol a 70%) e humedecer uma lamela. Esta deve ser colocada sobre o hemacitómetro e deve-se exercer uma ligeira pressão até serem visíveis anéis de refração de Newton.
3. Colocar cerca de 10 µl da suspensão de células com o Trypan Blue® nas câmaras do hemacitómetro e observar no microscópio.
4. Contar as células vivas (brilhantes, sem coloração azul). Idealmente devem ser contadas mais de 100 células para aumentar a precisão da contagem. [45]

O esquema de contagem do hemacitómetro encontra-se representado na figura C 1 e o cálculo das células viáveis e não viáveis faz-se de acordo com as equações seguintes:

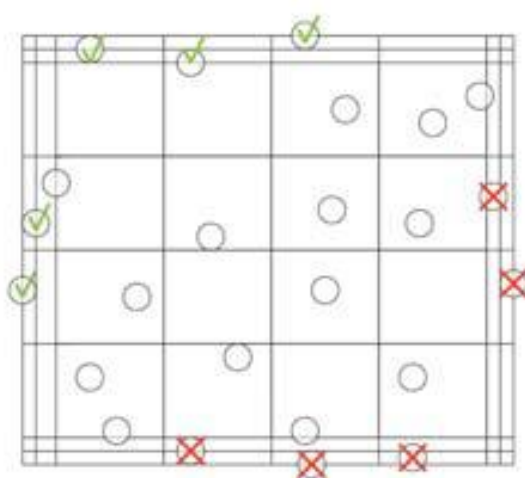
$$\begin{aligned} \text{Contagem de células viáveis (células vivas por mililitro)} &= \\ &= \frac{\text{Número de células vivas contadas}}{\text{Número de quadrados contados com 1mm de lado}} \times \text{diluição} \times 10000 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Contagem de células não viáveis (células mortas por mililitro)} &= \\ &= \frac{\text{Número de células mortas contadas}}{\text{Número de quadrados contados com 1mm de lado}} \times \text{diluição} \times 1000 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Percentagem de células viáveis (células por mililitro)} &= \\ &= \frac{\text{Número de células vivas contadas}}{\text{Número de células mortas contadas}} \times 100 \end{aligned}$$

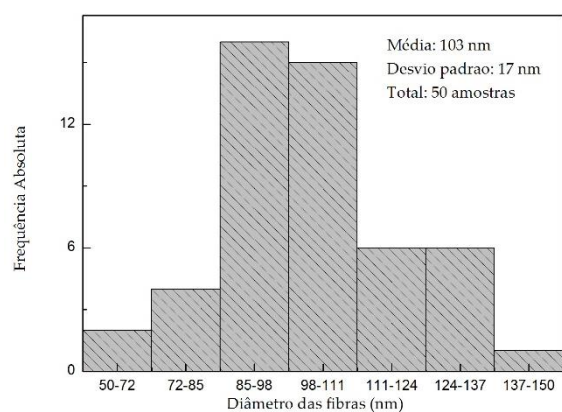


C 1 Esquema de contagem de um hemacitômetro. [45]

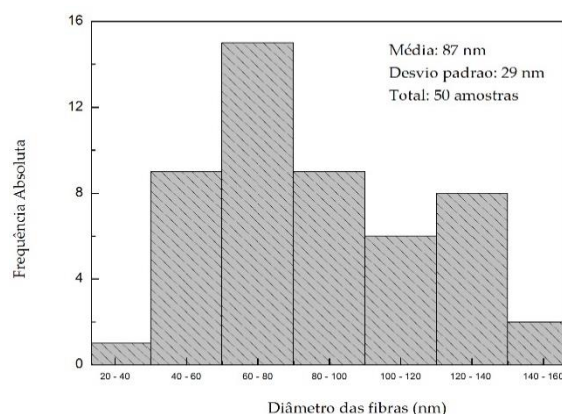
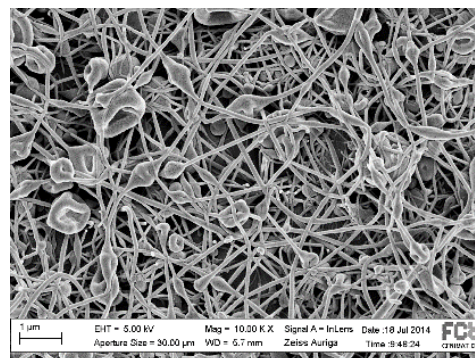


C 2 Guia para a contagem de células (incluir as células do meio da grelha e as que se encontram sobre os limites posterior e lateral esquerdo). [45]

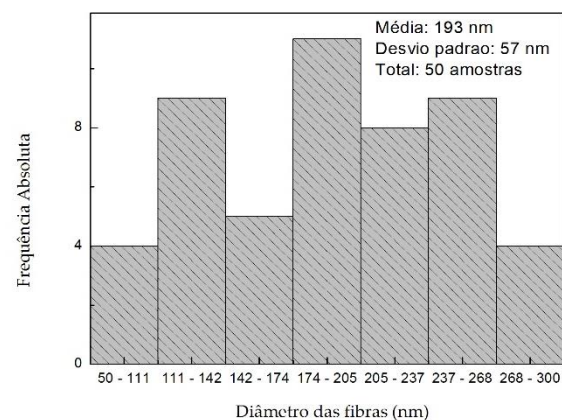
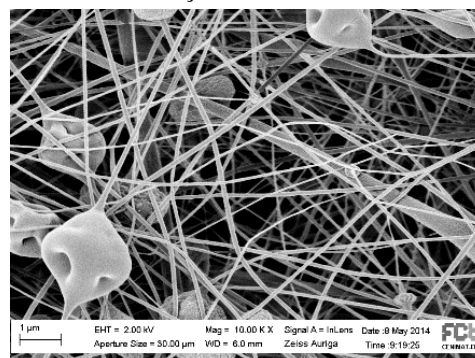
[45] S.-A. European Collection of Cell Cultures, *Fundamental Techniques in Cell Culture - Laboratory Handbook*, 2nd ed., vol. 1. 2010.

Anexo D – Estudo da otimização de produção de membranas por eletrofição

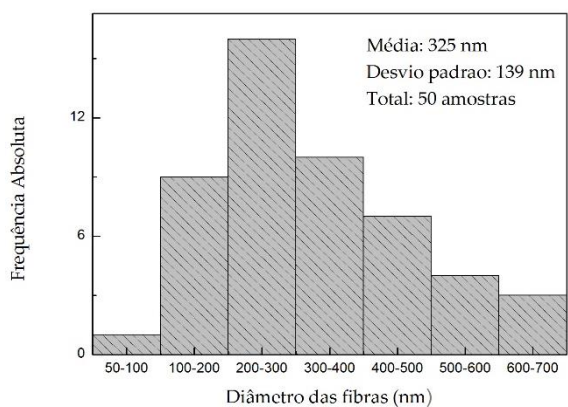
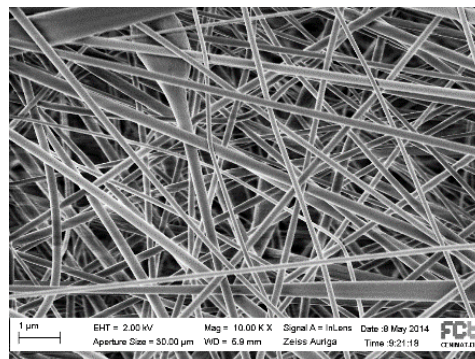
5% AC - Condições: 20kV, 15cm, 0,2ml/h



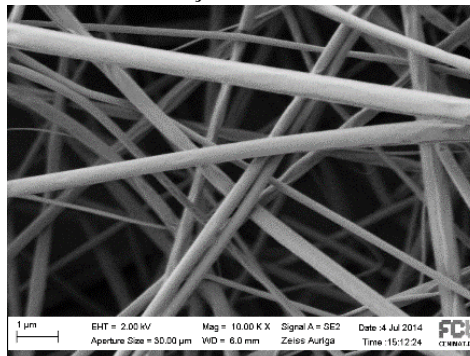
8% AC - Condições: 20kV, 15cm, 0,4ml/h

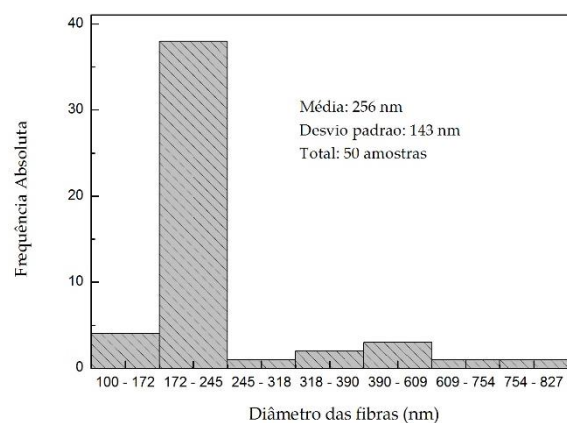


10% AC - Condições: 20kV, 15cm, 0,4ml/h

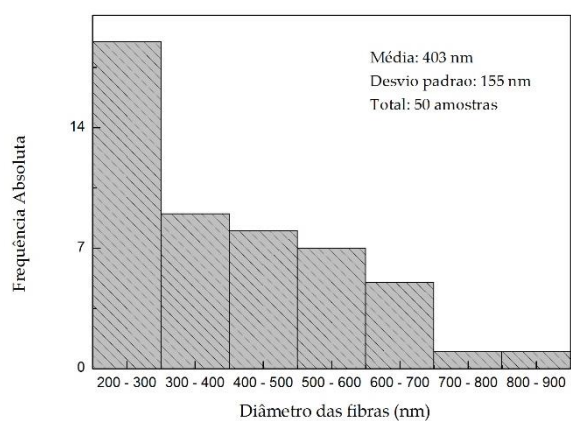
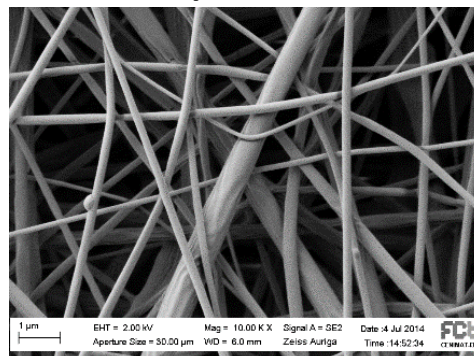


12% AC - Condições: 20kV, 15cm, 0,2ml/h

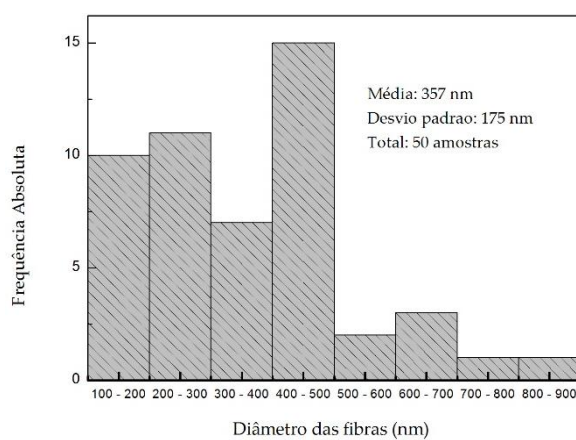
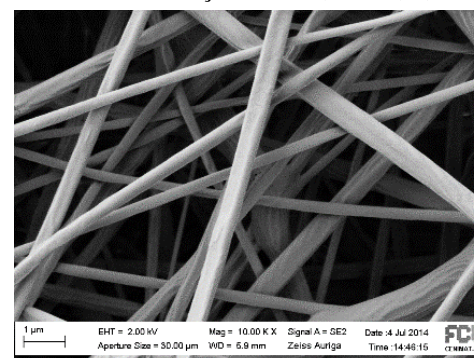




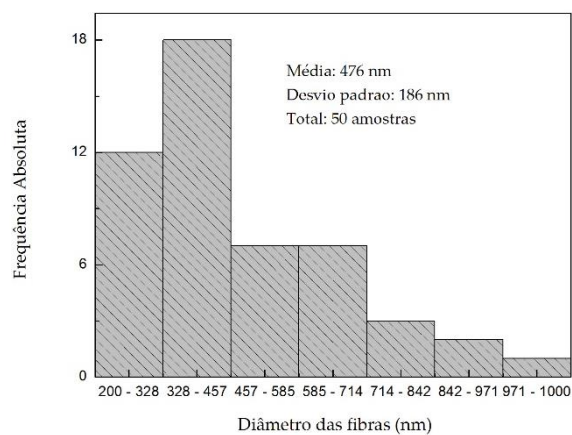
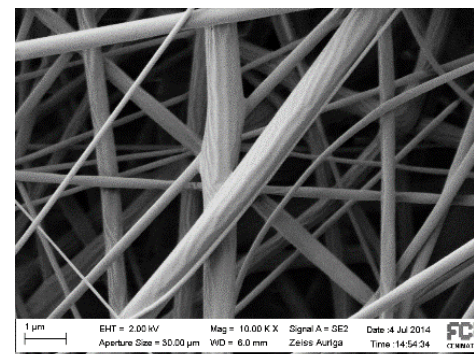
12% AC - Condições: 20kV, 10cm, 0,2ml/h



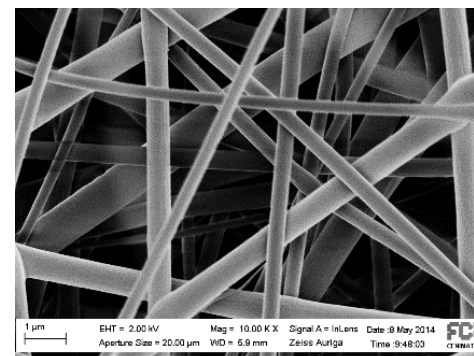
12% AC - Condições: 15kV, 10cm, 0,4ml/h



12% AC - Condições: 20kV, 10cm, 0,4ml/h

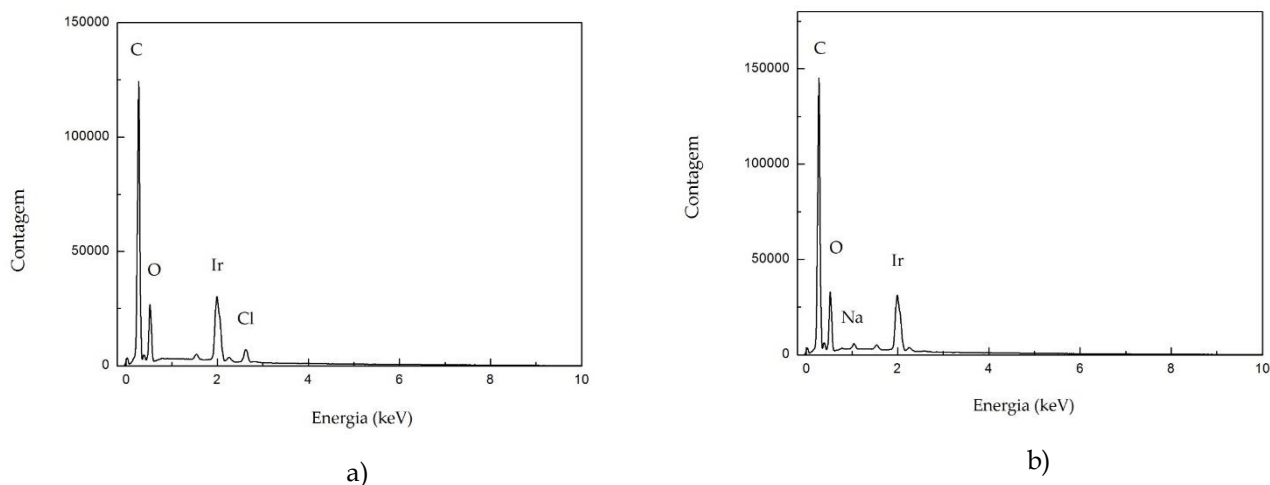


14% AC - Condições: 20kV, 15cm, 0,2ml/h



Anexo E – Espectros do mapeamento por EDS dos eletrodos poliméricos antes e após o estudo de degradação

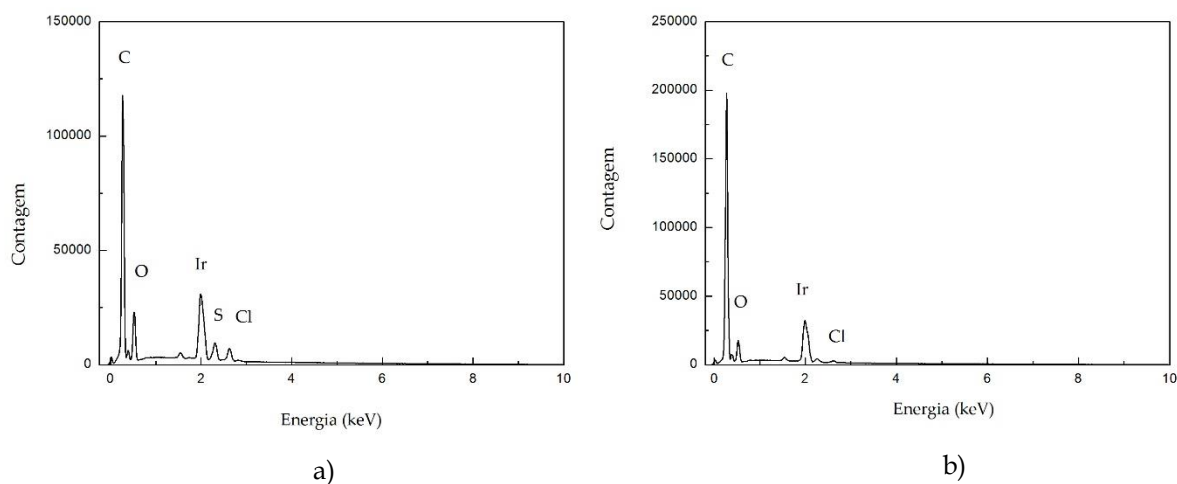
Polipirrol



E 1 Espectros do mapeamento por EDS para a polipirrol: a) anterior ao estudo de degradação e b) após o estudo de degradação

Para a membrana de PPi, que não sofreu o estudo de degradação, observa-se a presença de carbono aos 0,277 keV, oxigênio aos 0,525 keV, irídio a 1,980 e 2,254 keV e cloro a 2,622 e 2,816 keV. Após o estudo de degradação já não se observa o cloro, mas em vez disso verifica-se a presença de sódio a 1,041 keV, que deverá ser proveniente da solução de PBS.

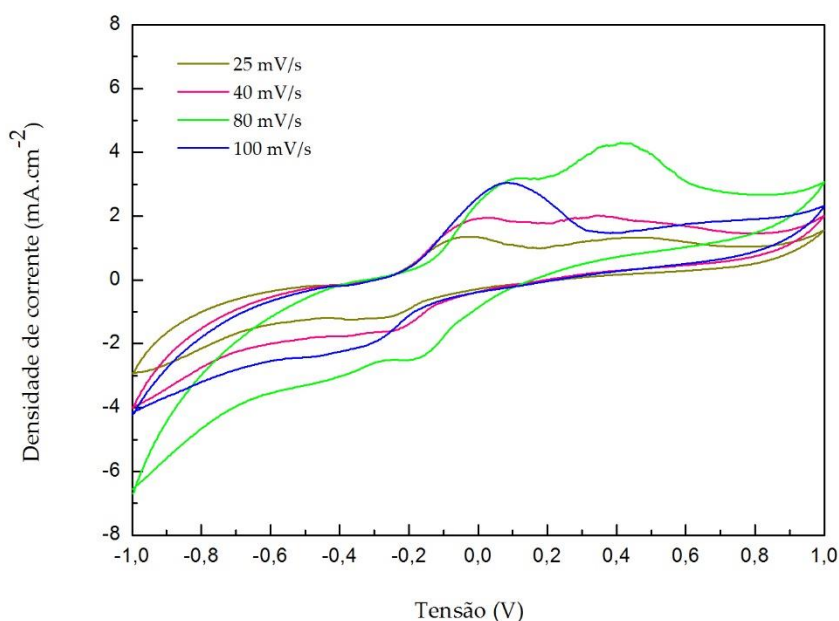
Polianilina



E 2 Espectros do mapeamento por EDS para a polianilina: a) anterior ao estudo de degradação e b) após o estudo de degradação

Para a membrana de PANi que não sofreu o estudo de degradação observa-se a presença de carbono aos 0,277 keV, oxigénio aos 0,525 keV, irídio a 1,980 e 2,254 keV, enxofre aos 2,308 keV e cloro a 2,622 e 2,816 keV. Após o estudo de degradação já não se deteta enxofre.

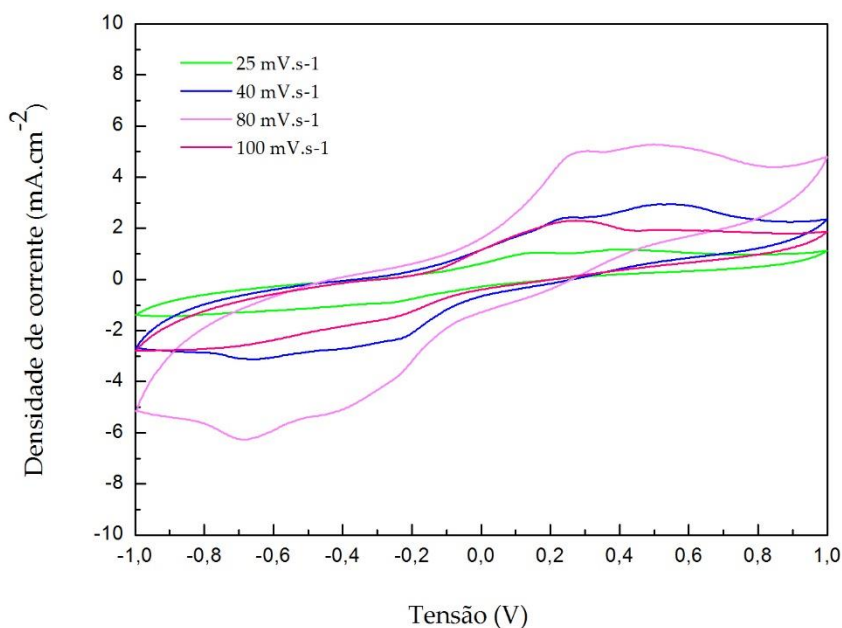
Anexo F - Influência das diferentes velocidades de varrimento e da espessura nos ensaios de voltametria cíclica



F 1 Voltamogramas para as várias velocidades de varrimento (25 mV/s, 40 mV/s, 80 mV/s e 100 mV/s) com os eletrodos PPI (E-T) /PAni (C-E) e eletrólito SBF.

É essencial que a velocidade de varrimento seja adequada ao dispositivo que estamos a utilizar, bem como ao eletrólito para que todas as reações que ocorram sejam detetadas corretamente. Se a velocidade de varrimento for demasiado elevada não será possível detetar todas as reações eletroquímicas e se esta for demasiado baixa podem-se detetar reações que não sejam importantes para o processo em causa. Para todas as velocidades de varrimento, os picos devem ocorrer todos para o mesmo valor de tensão para que a reação seja considerada reversível. No gráfico da figura F 1 observa-se que a melhor velocidade de varrimento a utilizar é a de 80 mV/s, pois é onde se observa uma melhor deteção dos picos.

No gráfico da figura F 2, estão presentes os voltamogramas para o mesmo conjunto de eletrodos mas com a utilização de uma solução de SBF, com uma concentração de glucose de 150 mg/dL. Neste sistema, existe uma boa deteção dos picos anódico e catódico para as velocidades de varrimento de 40 mV/s e 80 mV/s, no entanto, utilizou-se a velocidade de 80 mV/s para as soluções com glucose para que fosse mantida uma coerência com todo o estudo feito anteriormente apenas com a solução de SBF.

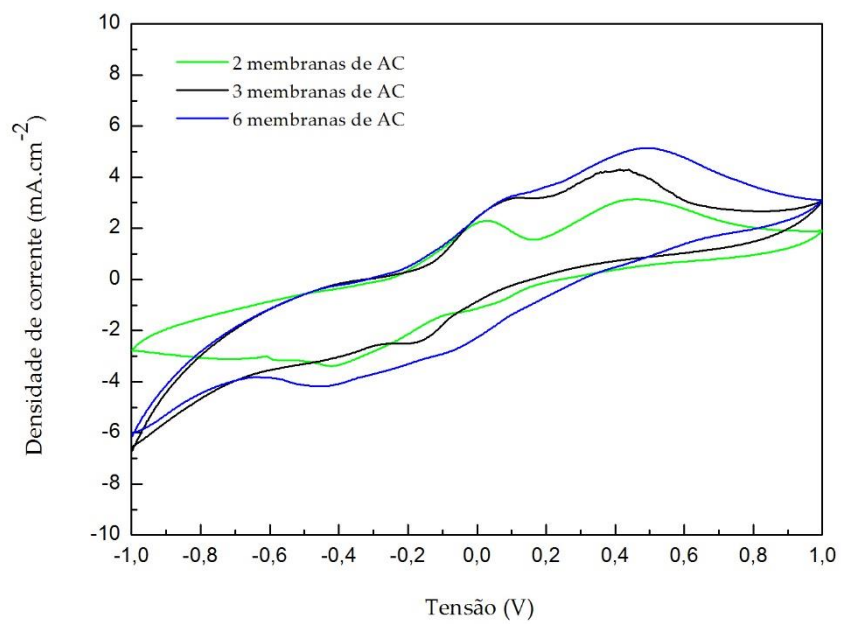


F 2 Voltamogramas para as várias velocidades de varrimento (25 mV/s, 40 mV/s, 80 mV/s e 100 mV/s) com os elétrodos PPi (E-T) /PAni (C-E) e eletrólito SBF com uma concentração de glucose de 150 mg/dL .

Influência da espessura da membrana

Foi também realizado um estudo para avaliar a influência da espessura da membrana na densidade de corrente registada. No gráfico da figura F 3, estão representados os voltamogramas para diferentes espessuras de membranas separadoras de AC: 2 membranas ($97,3 \pm 23,0 \mu\text{m}$), 3 membranas ($146,0 \pm 28,2 \mu\text{m}$) e 6 membranas ($292,0 \pm 39,9 \mu\text{m}$).

Com o aumento da espessura da membrana existe um aumento gradual da densidade de corrente e os picos anódico e catódico tornam-se mais evidentes. Com um maior número de membranas existe uma maior área superficial onde podem ocorrer reações de oxidação/redução, o que poderá promover uma melhor transferência de cargas entre os elétrodos.



F 3 Voltamogramas para as várias espessuras de membranas com os elétrodos PPi (E-T)/PAni (C-E) e eletrólito SBF